

Université de Montréal

Étude du régulateur transcriptionnel AtWhy1 chez *Arabidopsis thaliana*

par  
Jean-Nicholas Mess

Département de biochimie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.  
en biochimie

Septembre 2004

©, Jean-Nicholas Mess, 2004



W  
4  
U58  
2005  
V.059

## **AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## **NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude du régulateur transcriptionnel AtWhy1 chez *Arabidopsis thaliana*

présenté par :  
Jean-Nicholas Mess

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Sylvie Mader  
président-rapporteur

Normand Brisson  
directeur de recherche

Nathalie Beaudoin  
membre du jury

## Résumé

Pour les agents pathogènes, infecter une plante n'est pas chose facile. Ils doivent d'abord traverser une multitude de barrières physiques et biochimiques préformées. Ensuite, comme si ce n'était pas assez, la plante peut déclencher une réponse de défense spécifique suivant la reconnaissance de l'agent pathogène, laquelle conduira au changement du patron d'expression des gènes. Lors de l'interaction pomme de terre-*Phytophthora infestans*, l'expression du gène *PR-10a* est activée par le facteur de transcription Whirly StWhy1. Il a été démontré que la capacité de StWhy1 à lier l'ADN n'est présente qu'en situation de stress et que StWhy1 est entreposé sous forme inactive dans les tissus non-stressés. Nous avons donc émis l'hypothèse que StWhy1 interagirait avec un inhibiteur protéique dans les tissus non-stressés ce qui l'empêcherait de lier l'ADN. Pour identifier cette protéine, nous avons utilisé la méthode de purification d'affinité en tandem (TAP) chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Même si AtWhy1, l'orthologue de StWhy1 chez *Arabidopsis*, est également entreposé sous forme inactive dans les tissus non-stressés, les résultats obtenus par TAP ne suggèrent pas la présence d'un inhibiteur. Deux interacteurs potentiels ont été repêchés : le Whirly AtWhy3 et une protéine à domaine ENTH. De plus, nous avons démontré que la protéine AtWhy1-TAP est active et qu'elle localise aux noyaux et aux chloroplastes.

Pour évaluer le rôle de AtWhy1 lors de la réponse de défense, des plants d'*Arabidopsis* mutants pour le gène *AtWhy1* ont été obtenus du projet TILLING. Dans la seconde partie de ce mémoire, nous avons caractérisé l'activité de liaison à l'ADN des protéines AtWhy1 mutantes. Chacune de ces protéines montre une diminution de leur activité de liaison à l'ADN. Les plants mutants *atwhy1* seront des outils de premier choix pour l'étude du rôle de AtWhy1.

**Mots clés :** Whirly, facteurs de transcription, gènes *PR*, réponse de défense des plantes, purification d'affinité en tandem (TAP), TILLING.

## Abstract

For pathogens, to invade a plant is not an easy task. They first have to get through a variety of preformed physical and biochemical defenses. Then, as if it was not enough, plants can also trigger a specific defense response after successful recognition of the pathogen, which leads to massive changes in gene expression. In the potato–*Phytophthora infestans* interaction, the expression of the *PR-10a* gene is activated by the Whirly transcription factor StWhy1. It was shown that StWhy1 can bind DNA only in stressed tissues while that StWhy1 is stored in an inactive form in non-stressed tissues. We have therefore postulated that StWhy1 is bound to an inhibitor in non-stressed tissues preventing its binding to DNA. To identify this inhibitor, we have used the tandem affinity purification (TAP) method in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Even if the *Arabidopsis* StWhy1 ortholog AtWhy1 is also stored inactive in non-stressed tissues, the results obtained by TAP do not suggest the presence of an inhibitor. Two putative interactors were found: the Whirly AtWhy3 and an ENTH-domain containing protein. We have also shown that the AtWhy1-TAP fusion protein was active and localised to both nuclei and chloroplasts.

To examine the role of AtWhy1 in defense response, we have obtained *Arabidopsis* plants mutated in the *AtWhy1* gene from the *Arabidopsis* TILLING Project. In the second part of this research, we present a molecular characterisation of these AtWhy1 mutant proteins in terms of their DNA binding activities. Each mutant protein displays decreased levels of AtWhy1 DNA binding activity. These *atwhy1* mutant plants will be useful tools to study the role of AtWhy1.

**Key words:** Whirly, transcription factors, *PR* genes, plant defense response, tandem affinity purification (TAP), TILLING.

## Table des matières

<b>Résumé.....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>ix</b>
<b>Listes des sigles et abréviations.....</b>	<b>x</b>
<b>Dédicace.....</b>	<b>xiii</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1.0 Revue de littérature.....</b>	<b>1</b>
1.1 Introduction.....	1
1.2 Les mécanismes de défense généraux.....	2
1.2.1 La résistance non-hôte.....	2
1.2.2 Les barrières physiques.....	2
1.2.3 Les barrières biochimiques.....	3
1.3 La réponse de défense.....	4
1.3.1 L'interaction gène-pour-gène.....	4
1.3.2 L'hypothèse du gardien.....	5
1.3.3 Les gènes de résistance.....	5
1.3.4 Les réponses immédiates suivant l'attaque d'agents pathogènes.....	6
1.3.5 La réponse hypersensible.....	9
1.3.6 Les protéines PR.....	10
1.3.7 La résistance systémique acquise.....	11
1.3.8 Les hormones éthylène et acide jasmonique.....	13
1.3.9 Implication de la lumière et des chloroplastes dans la réponse de défense.....	14

1.4 Les facteurs de transcription.....	16
1.4.1 Les TGA/OBF.....	16
1.4.2 Les WRKY.....	17
1.4.3 Les ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERF).....	19
1.5 Les facteurs de transcription Whirly.....	20
1.5.1 L'interaction <i>Phytophthora infestans</i> – Pomme de terre.....	20
1.5.2 Induction de <i>PR-10a</i> chez la pomme de terre.....	21
1.5.3 Éléments <i>cis</i> de régulation du promoteur de <i>PR-10a</i> .....	22
1.5.4 Le facteur nucléaire PBF-2.....	22
1.5.5 Rôle des Whirly lors de la réponse de défense.....	24
1.5.6 Régulation de l'activité de StWhy1.....	24
1.5.7 Hypothèse et objectifs du projet.....	25
<b>2.0 Matériel et méthodes.....</b>	<b>27</b>
2.1 Matériel végétal et croissance des plantes.....	27
2.2 Traitement des plantes.....	27
2.3 Fractionnement cellulaire.....	27
2.4 Retardement sur gel.....	28
2.5 Chromatographie sur Q-Sépharose.....	29
2.6 Construction <i>pDEX AtWhy1-TAP</i> .....	29
2.7 Transformation des plantes par Agrobactérium et sélection.....	30
2.8 Extraction rapide des protéines totales.....	30
2.9 Purification d'affinité en tandem.....	30
2.10 Clonage de <i>AtWhy1</i> et des gènes mutés <i>atwhy1.1</i> et <i>atwhy1.2</i> pour expression dans <i>E. coli</i> .....	31
2.11 Expression des protéines recombinantes dans <i>E. coli</i> et purification...	32
2.12 Filtration sur gel.....	32
2.13 Immunobuvardage.....	32



<b>3.0 Résultats.....</b>	<b>33</b>
3.1 Identification des interacteurs de AtWhy1 par purification d'affinité en tandem .....	33
3.1.1 La famille Whirly chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	33
3.1.2 Liaison à l'ADN des Whirly chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	33
3.1.3 La méthode TAP.....	39
3.1.4 Localisation subcellulaire de AtWhy1-TAP.....	42
3.1.5 Les plants <i>DEX::TAP</i> surexpriment <i>PR-1</i> suite au traitement au SA.....	45
3.1.6 Purification d'affinité en tandem de AtWhy1.....	48
3.1.7 Confirmation de l'interaction avec la RCA.....	51
3.2 Caractérisation des mutants TILLING du gène AtWhy1 chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	57
3.2.1 Les mutants TILLING de AtWhy1.....	57
3.2.2 Les mutations <i>atwhy1.1</i> et <i>atwhy1.2</i> affectent l'activité de liaison à l'ADN des Whirly.....	60
3.2.3 Effet de la mutation <i>atwhy1.2</i> sur la stabilité du tétramère.....	63
3.2.4 L'accumulation de la protéine <i>atwhy1.2</i> est affectée dans le mutant <i>atwhy1.2</i> .....	63
<b>4.0 Discussion.....</b>	<b>69</b>
4.1 Mécanisme de régulation des Whirly.....	69
4.2 Interaction entre AtWhy1 et AtWhy3.....	72
4.3 Régulation de l'expression de <i>PR-1</i> par AtWhy1.....	73
4.4 À la recherche d'interacteurs SA-dépendants.....	74
4.5 Double localisation de AtWhy1.....	75
4.6 Implication du domaine ENTH dans la double localisation de AtWhy1..	76
4.7 Les mutants <i>atwhy</i> : des outils pour l'étude de la fonction de AtWhy1...	80
<b>5.0 Conclusion et perspectives.....</b>	<b>83</b>
<b>6.0 Références.....</b>	<b>84</b>

## Liste des tableaux

Tableau I. Classification des protéines PR.....	11
Tableau II. Protéines identifiées par LC/MS/MS qui ont co-purifié avec AtWhy1-TAP lors des analyses de purification d'affinité en tandem.....	54

## Liste des figures

Figure 1.	La famille des Whirly chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	34
Figure 2.	Les extraits nucléaires d' <i>Arabidopsis</i> montrent une activité de liaison à l'ADN de type Whirly.....	37
Figure 3.	Représentation schématique et expression inductible de la construction <i>AtWhy1-TAP</i> .....	40
Figure 4.	<i>AtWhy1-TAP</i> localise aux noyaux et aux chloroplastes.....	43
Figure 5.	Les plants transgéniques <i>DEX::TAP</i> surexpriment <i>PR-1</i> suite au traitement au SA.....	46
Figure 6.	Purification d'affinité en tandem.....	52
Figure 7.	La RCA se fixe non-spécifiquement à la colonne de IgG.....	55
Figure 8.	Les extraits nucléaires des mutants <i>atwhy1.1</i> et <i>atwhy1.2</i> montrent une diminution de l'activité de liaison à l'ADN des Whirly.....	58
Figure 9.	Les mutations <i>atwhy1.1</i> et <i>atwhy1.2</i> affectent la liaison à l'ADN.	61
Figure 10.	La protéine <i>atwhy1.2</i> ne forme pas de tétramères.....	64
Figure 11.	L'accumulation de la protéine <i>atwhy1.2</i> est affectée dans les mutants <i>atwhy1.2</i> .....	67

## Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNsb	ADN simple brin
ANP1	<i>Arabidopsis</i> NPK1-like protein kinase
APX2	Ascorbate peroxydase2
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
<i>as-1</i>	Activation sequence-1
<i>AtWhy1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> Whirly 1
Avr	Avirulence
<i>AvrRpt2</i>	Protéine d'avirulence 2 de <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>
bZIP	Basic domain leucine zipper
CC	Coiled coil
<i>cdc2</i>	Cell division cycle 2
CDPK	Calcium dependent protein kinase
Cf	<i>Cladosporium fulvum</i>
<i>CHIB</i>	ChitinaseB
<i>coi1</i>	coronatine insensitive
CPM	Coup par minute
DCMU	3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl urée
DEX	Dexaméthasone
<i>DIR1</i>	defective in induced resistance 1
<i>dnd</i>	defense no death
EAO	Espèces actives de l'oxygène
<i>EDS1</i>	enhanced disease susceptibility
<i>ein2</i>	ethylene insensitive2
ENTH	Epsin N-terminal homology
ERE	Elicitor response element

ERF	Ethylene response factor
ET	Éthylène
<i>fad</i>	fatty acid desaturase
Fen	Fenthion sensitivity
GFP	Green fluorescent protein
<i>GST</i>	Glutathione S-transferase
<i>HEL</i>	Hevein like
IgG	Immunoglobuline G
ISR	résistance systémique induite
JA	Acide jasmonique
<i>jar1</i>	jasmonic acid resistant 1
kDa	kilodalton
kb	kilobase
LC/MS/MS	Chromatographie liquide / Spectrométrie de masse / Spectrométrie de masse
LRR	Leucine-rich repeat
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAPKKK	Mitogen activated protein kinase kinase kinase
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NB	Nucleotide binding
NO	Oxyde nitrique
NP40	Nonidet-P40
NPR1	Non-expressor of <i>PR1</i>
OBF	ocs element binding factor
<i>PAD4</i>	phytoalexin-deficient 4
PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide
PB	PBF-2 binding
PBF-2	<i>PR-10a</i> binding factor 2
PCR	Réaction de polymérase en chaîne
PDC	Pyruvate décarboxylase

PDF1.2	Plant defensin1.2
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphates
PKC	Protéine kinase C
PR	Pathogenesis related
Pti4	Pto interacting protein 4
Pto	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> resistance locus
PS	Photosystème
R	Résistance
RCA	Rubisco activase
RIN4	RPM1 interacting protein 4
RPM1	Resistance to <i>P. syringae</i> expressing <i>AvrRpm1</i>
RRS1-R	Resistance to <i>Ralstonia solanacearum</i> 1
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR
SA	Acide salicylique
SABP	Salicylic acid binding protein
SAR	Résistance systémique acquise
SARP	Salicylic acid response protein
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SE	Silencing element
SEBF	Silencing element binding factor
SIPK	Salicylic acid-induced protein kinase
StWhy1	<i>Solanum tuberosum</i> Whirly 1
TAP	Purification d'affinité en tandem
TEP	Transport d'électrons photosynthétiques
TEV	Virus de la gravure du tabac
TGA	TGACG sequence DNA-binding protein
TILLING	Targeting induced local lesions in genome
TIR	Toll / Interleukin-1 receptor
WIPK	Wounding-induced protein kinase

À mes parents qui ont cru en moi tout au long de mes études.

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier le Dr Normand Brisson pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci au CRSNG pour ma bourse d'étude. Merci aux « ancêtres » Brian et Darrell pour le soutien technique et le flot continu de nouvelles idées. Merci à Alex J. pour l'initiation à la voile sur la mer Méditerranée. Merci à Alex M. pour les anticorps contre AtWhy1. Merci infiniment à Jean-Sébastien pour les billets de la Coupe du monde de hockey 2004. Merci à tous les autres membres du laboratoire que j'ai côtoyés, Annie, Caro, Cyr, J.-F., Jonathan, Laurent, Nathalie, Nico, Mathieu et Vicky pour l'agréable atmosphère de travail qu'ils ont créée. Je remercie finalement M. Falafel pour les bons repas éclairs entre deux expériences.

Merci à mes amis Ben, Chris, Jordan, P.-A., Vince et Yann pour les soirées à écouter le hockey, jouer au XBOX et boire de la bière. Un gros merci à mon meilleur « chum » Luc pour avoir compris que des études en science peuvent être parfois très demandantes. Finalement, je remercie ma copine Sanny pour sa grande compréhension et son précieux support moral.



## 1.0 Revue de littérature

### 1.1 Introduction

Les plantes livrent un éternel combat face aux agents pathogènes qui les entourent. Cependant, ces virus, bactéries, nématodes et champignons ne réussissent que très rarement à causer la maladie. La plupart du temps, ils sont freinés par les différents mécanismes de défense adoptés par les végétaux. Malheureusement, dans certains cas, les agents pathogènes contournent avec succès les défenses mises en place par les plantes et causent ainsi la maladie, ce qui met en péril la survie de la plante infectée.

Ces interactions plantes-agents pathogènes ont également eu des effets nocifs sur les civilisations humaines depuis que celles-ci dépendent de l'agriculture comme source de nourriture. À titre d'exemple, la grande famine irlandaise des années 1840 est la conséquence directe du mildiou de la pomme de terre, une maladie causée par l'oomycète *Phytophthora infestans* (Agrios, 1988). On estime que la population irlandaise a chuté de 2 millions à cette époque à cause de l'émigration et des décès. Plusieurs Irlandais ont trouvé refuge au Québec et on dénombre environ 40% de Québécois capables de retracer un ancêtre Irlandais.

Une telle situation est moins propice à se produire aujourd'hui car les peuples ne reposant que sur une monoculture pour subsister se font plus rares. Également, les progrès dans le domaine de l'agriculture ont conduit à l'élaboration de différentes méthodes pour limiter les dommages causés par les agents pathogènes. Tout de même, on enregistre à chaque année plusieurs millions de dollars en pertes reliées aux attaques d'agents pathogènes. De plus, notre planète se fait de plus en plus peuplée et la disponibilité des terres cultivables diminue. On se doit alors de maximiser le rendement de chaque

culture. Il est donc impératif de comprendre comment les plantes se défendent face aux agents pathogènes afin d'établir des nouvelles stratégies plus efficaces pour contrôler les maladies.

## **1.2 Les mécanismes de défense généraux**

### **1.2.1 La résistance non-hôte**

La résistance que possède une espèce entière de plante face à un agent pathogène spécifique est appelée résistance non-hôte. Elle est présente chez toutes les plantes et leur confère une immunité contre la vaste majorité des agents pathogènes (Heath, 2000). La résistance non-hôte est souvent la somme d'un système de protection préformé et d'une réponse induite (Holub et al, 2004). Cette réponse induite peut être déclenchée par des « éliciteurs non-spécifiques » présents chez plusieurs agents pathogènes. La flagelline par exemple, une protéine très conservée du flagelle bactérien, peut agir comme éliciteur général de la résistance non-hôte (Félix et al, 1999). Les mécanismes induits lors de ce type de résistance partagent plusieurs caractéristiques avec la résistance hôte et peuvent mener à une mort cellulaire programmée au site d'infection (voir section 1.3). Une réponse induite n'est cependant pas indispensable à la résistance non-hôte puisque dans bien des cas, les barrières préformées d'ordre physique et biochimique sont suffisantes (Heath, 2000).

### **1.2.2 Les barrières physiques**

Les barrières physiques préformées constituent les premières lignes de défense contre l'attaque des agents pathogènes. L'épiderme de la feuille est composé d'une couche de cellules serrées qui la protègent du contact avec le milieu extérieur. La cuticule cireuse de l'épiderme, en plus d'être un obstacle à la pénétration des envahisseurs, prévient la formation de gouttelettes d'eau

nécessaires à la multiplication des agents pathogènes tels les mycètes et les bactéries (Agrios, 1988). L'épaisse paroi des cellules de l'épiderme, de par sa composition riche en polymères telle la cellulose, offre une protection difficilement pénétrable par la majorité des micro-organismes (Taiz et Zeiger, 1998). Tout de même, certains agents pathogènes sont capables de percer ces défenses à l'aide d'enzymes hydrolytiques. En ce faisant, ils libèrent ainsi différents oligosaccharides qui peuvent servir d'éliciteurs généraux pour déclencher chez la plante des mécanismes de défense plus complexes (Heath, 2000). En plus des fonctions de protection, les barrières physiques préformées peuvent donc être impliquées dans la détection des agents pathogènes.

### **1.2.3 Les barrières biochimiques**

Les agents pathogènes capables de traverser les barrières physiques doivent maintenant faire face à une multitude de composés organiques produits de façon constitutive par la plante. Ces composés sont fréquemment issus du métabolisme secondaire, c'est-à-dire que contrairement aux métabolites primaires, ceux-ci ne semblent pas nécessaires à la survie de la plante (Buchanan et al, 2000). Ces métabolites secondaires sont souvent toxiques pour les micro-organismes et les insectes. Plusieurs d'entre eux sont dérivés des voies de synthèse des isoprénoïdes, des phénylpropanoïdes, des alkaloïdes et des acides gras (Dixon, 2001). Certains sont synthétisés sous forme active tandis que d'autres, tel l'inhibiteur de la respiration cellulaire cyanure d'hydrogène, sont entreposés sous forme de glycoside inactif. Ce sont les enzymes de la plante, lors de l'attaque d'agents pathogènes ou lorsque le tissu est endommagé, qui convertiront le précurseur en sa forme active (Wittstock et Gershenzon, 2002).

## 1.3 La réponse de défense

Les mécanismes de protection décrits à la section 1.2, quoique très efficaces contre la grande majorité des agents pathogènes, ne sont pas infaillibles. Certains micro-organismes sont capables de contourner les barrières physiques et de tolérer les toxines produites par la plante. Pour se défendre, la plante doit donc reconnaître spécifiquement la présence de l'agent pathogène pour ainsi déclencher une réponse de défense adéquate. Cette résistance hôte, contrairement à la résistance non-hôte, n'est présente que chez certains cultivars à l'intérieur d'une espèce entière qui est normalement susceptible à l'infection.

### 1.3.1 L'interaction gène-pour-gène

Selon cette hypothèse, le résultat de l'interaction entre le produit d'un gène de résistance (*R*) présent chez la plante et le produit d'un gène d'avirulence (*Avr*) présent chez l'agent pathogène serait l'événement déclencheur de la réponse de défense. La protéine *R* serait perçue comme étant un récepteur qui interagirait avec la protéine *Avr* de l'agent pathogène selon un modèle de type récepteur-ligand. La complémentarité *R-Avr* propose qu'un mécanisme de transduction du signal s'initierait lorsqu'un récepteur *R* reconnaît une protéine *Avr* spécifique, activant ainsi la réponse de défense et permettant de ce fait la résistance. On dit alors que l'interaction entre la plante et l'agent pathogène est incompatible. La plante est donc résistante à la maladie et l'agent pathogène est dit avirulent. Cependant, si le gène *R* de la plante ou le gène *avr* de l'agent pathogène sont absents, l'agent pathogène ne serait pas détecté et il y a infection. Dans ce cas, l'interaction entre la plante et l'agent pathogène est dite compatible, la plante est susceptible à l'infection et l'agent pathogène est virulent (Hammond-Kosack et Jones, 1996).

Quoique l'hypothèse d'interaction gène-pour-gène soit plausible, l'interaction directe entre les protéines R et les protéines Avr n'a été démontrée que dans un nombre de cas assez restreint (résumé dans Martin et al, 2003). D'autres hypothèses ont donc été émises pour expliquer le rôle joué par les gènes *R* et *avr*. L'hypothèse du gardien (« *guard hypothesis* ») est particulièrement intéressante.

### 1.3.2 L'hypothèse du gardien

Pourquoi un agent pathogène exprimerait-il un gène *avr* si celui-ci trahit sa présence à la plante ? Il a été démontré dans certains cas que le gène *avr* était impliqué dans le processus d'infection et que la perte du gène *avr* par l'agent pathogène menait à une diminution de sa virulence (Kjemtrup et al, 2000). Selon l'hypothèse du gardien, le produit du gène *avr* aurait une cible moléculaire spécifique chez la cellule végétale. Cette cible serait en association constitutive avec le produit du gène *R* appelé le gardien. Lors de l'attaque de l'agent pathogène, le produit du gène *avr* interagirait ou modifierait la protéine cible, aussi nommée la protéine gardée. La protéine R percevrait cette modification de la protéine gardée, s'en dissocierait et émettrait un signal qui activerait la réponse de défense. Alternativement, l'interaction entre le gardien et la gardée serait possible seulement après liaison de la protéine Avr à la protéine gardée. C'est alors ce complexe ternaire qui déclencherait la réponse de défense (Dangl et Jones, 2001). Le système comprenant le gène *R RPM1*, le gène *avr AvrRpm1* et la protéine gardée RIN4 supporte cette hypothèse (Mackey et al, 2002).

### 1.3.3 Les gènes de résistance

De plus en plus de gènes *R* sont identifiés et leur importance dans la réponse de défense contre les bactéries, les virus, les champignons, les

nématodes et même les insectes s'intensifie à chaque jour. Pour pouvoir répondre à des attaques provenant d'agresseurs aussi différents, nous pourrions nous attendre à ce que les gènes *R* soient très diversifiés. Pourtant, ceux-ci peuvent être regroupés dans seulement 5 classes. La classe 1 renferme des protéines cytoplasmiques qui possèdent un domaine de liaison aux nucléotides (NB) et un domaine C-terminal riche en leucine (LRR). Les domaines LRR peuvent être retrouvés dans d'autres protéines et sont impliqués dans les interactions protéine-protéine et protéine-glucide. Aucun rôle clair n'a encore été attribué au domaine NB. Les gènes NB-LRR peuvent être sous-divisés en deux groupes possédant une région N-terminale différente. Un de ces groupes est formé d'un domaine TIR, nommé par homologie avec le récepteur Toll et le récepteur de l'interleukine-1, tandis que l'autre possède un domaine de spire enroulée CC (« *coiled coil* »). Le génome d'*Arabidopsis* contient environ 150 gènes possédant une homologie avec le domaine NB-LRR, faisant de cette famille de gènes *R* la plus imposante (Dangl et Jones, 2001).

La classe 2 est formée des protéines Cf-X de la tomate. Contrairement à la classe 1, ces protéines possèdent un domaine transmembranaire et un domaine LRR extracellulaire. La troisième classe contient seulement deux membres, ce sont les kinases cytoplasmiques Pto et Fen. Les protéines de la quatrième classe sont semblables aux protéines Cf-X mais possèdent un domaine kinase intracellulaire. Finalement, la dernière classe contient seulement un membre possédant un domaine CC intracellulaire et une hélice membranaire, c'est la protéine RPW8 d'*Arabidopsis* (Dangl et Jones, 2001).

#### **1.3.4 Les réponses immédiates suivant l'attaque d'agents pathogènes**

Une fois que l'agent pathogène est détecté et que les protéines *R* envoient leur signal d'alerte, une multitude de réactions sont déclenchées

localement dans les minutes suivant l'attaque. Un des premiers phénomènes observés consiste en l'ouverture de canaux calciques menant à l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Ce signal sera par la suite intégré par l'activation de protéines phosphatases et kinases dépendantes du calcium (Grant et Mansfield, 1999). Outre le flux calcique, un influx net de protons aura comme conséquence une acidification du milieu intracellulaire. Il a été observé chez le pavot que cette acidification engendre l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de phytoalexines, des petites molécules possédant des activités anti-microbiennes (Roos et al, 1999).

La flambée oxydative est un autre événement primordial de la réponse de défense. Elle est caractérisée par l'accumulation rapide d'espèces actives de l'oxygène (EAO) tels l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ). La majorité des EAO proviennent de la NADPH oxydase membranaire, une enzyme possédant un domaine de liaison au calcium. Il est donc possible que le calcium ait un rôle direct sur l'accumulation de EAO via l'activation de cette enzyme (Grant et Mansfield, 1999). L'oxalate oxydase, les peroxydases apoplastiques et même potentiellement la mitochondrie et le chloroplaste pourraient être des sources de EAO. Les EAO remplissent plusieurs rôles lors de la réponse de défense ; ils sont souvent toxiques pour les agents pathogènes, peuvent permettre la solidification de la paroi cellulaire en pontant de façon covalente les protéines riches en prolines et peuvent induire l'expression de plusieurs gènes reliés à la défense (Bolwell, 1999). Les EAO sont également des joueurs de premier plan lors de la mort cellulaire programmée faisant partie de la réponse hypersensible (section 1.3.5) et dans la résistance systémique acquise (section 1.3.7).

L'attaque par un agent pathogène avirulent conduit également à l'accumulation rapide d'oxyde nitrique (NO), un second messager connu depuis longtemps chez les mammifères mais récemment découvert chez les plantes.

Tout comme les EAO, le NO semble être impliqué dans la réponse hypersensible et dans l'induction de plusieurs gènes de défense tels que celui codant pour la phénylammonia lyase, une enzyme clé dans la synthèse des phytoalexines. De plus, il a été montré que bloquer la synthèse de NO à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques diminuait grandement l'amplitude de la réponse hypersensible chez *Arabidopsis* infecté avec *Pseudomonas syringae*. L'enzyme responsable de la synthèse du NO lors de la réponse de défense a récemment été identifiée, il s'agit d'un homologue de la protéine P du complexe de la glycine décarboxylase. Étonnamment, cette enzyme ne partage aucune homologie avec les synthases de l'oxyde nitrique chez les mammifères, ce qui laisse croire qu'elle emploie un mécanisme différent (Wendehenne, 2004).

Les signaux provenant des messagers décrits ci-haut sont intégrés en une réponse cohérente par différentes protéines kinases. La hausse de calcium intracellulaire observée durant la réponse de défense active les kinases dépendantes du calcium CDPK. Leurs fonctions ne sont pas encore toutes comprises mais il a été suggéré que des sous-unités cytoplasmiques de la NADPH oxydase membranaire seraient phosphorylées par une CDPK, ce qui permettrait leur translocation à la membrane et la production de EAO (Cheng et al, 2002). Les EAO à leur tour activent la voie des MAPK chez *Arabidopsis* par l'activation de la MAPKKK ANP1. L'activation de cette MAPKKK conduira finalement à l'activation des MAPK AtMPK3 et AtMPK6, les orthologues des MAPK WIPK et SIPK induites lors de la réponse de défense chez le tabac (Peck SC, 2003). Les composantes des voies des MAPK commencent à être élucidées dans plusieurs interactions plantes-agents pathogènes, indiquant donc leurs rôles centraux lors du déclenchement de la réponse de défense (résumé dans Jonak C et al, 2002). Plusieurs de ces événements de signalisation convergent vers le noyau où ils induisent l'expression de gènes impliqués dans la réponse de défense et dans la mort cellulaire programmée, ce qui conduira à la réponse hypersensible.



### 1.3.5 La réponse hypersensible

La réponse de défense est souvent accompagnée d'une mort cellulaire aux sites d'infection, un phénomène appelé réponse hypersensible. Elle se produit généralement quelques heures suivant le contact de l'agent infectieux. La fonction principale de la réponse hypersensible serait de limiter la colonisation de l'agent pathogène. Dans le cas de l'interaction avec un agent pathogène biotrophe, la mort cellulaire priverait l'envahisseur de nutriments produits par la cellule végétale. D'un autre côté, les agents pathogènes nécrotrophes (qui survivent sur des tissus morts), seraient attaqués par différentes enzymes hydrolytiques ou composés anti-microbiens libérés par la cellule lors du processus de mort cellulaire (Hammond-Kosack et Jones, 1996). La réponse hypersensible n'est cependant pas absolument nécessaire à la résistance. En effet, les mutants *dnd* (« *defense, no death* ») d'*Arabidopsis* maintiennent une résistance à l'infection par l'agent pathogène *P. syringae* *avrRpt2* ou *avrRpm1* sans déclencher de réponse hypersensible (Jurkowski et al, 2004).

La réponse hypersensible et l'apoptose chez les mammifères partagent plusieurs points communs dont l'augmentation de la concentration de calcium cytoplasmique et la production de EAO. Plusieurs recherches tentent donc de démontrer l'implication d'une mort cellulaire programmée semblable à l'apoptose dans le processus de réponse hypersensible. Cependant, plusieurs protéines régulatrices de la mort cellulaire chez les mammifères, *C.elegans* et *Drosophila* sont absentes du génome d'*Arabidopsis*, ce qui laisse croire que les plantes utilisent d'autres mécanismes pour déclencher la mort cellulaire programmée (Lam et al, 2001).

### 1.3.6 Les protéines PR

La réponse hypersensible est accompagnée par l'induction d'un groupe de protéines présentes chez toutes les espèces de plantes, les protéines PR (« *pathogenesis related* »). Elles sont définies comme étant induites par la présence de divers agents pathogènes, mais également lors de stress et en présence d'éliciteurs microbiens. L'accumulation des protéines PR ne se fait pas seulement localement au site d'infection mais également dans les tissus non-infectés dans un mécanisme de défense global appelé résistance systémique acquise (SAR ; Van Loon et Van Strien, 1999).

Les protéines PR sont maintenant regroupées en 14 familles différentes (tableau I, page suivante). La plupart d'entre elles sont reconnues pour avoir des propriétés anti-microbiennes *in vivo* et *in vitro*. Par exemple, la classe des protéines PR-2 et PR-3, -4, -8, -11 ont des activités  $\beta$ -1,3-glucanase et chitinase, respectivement. Elles peuvent donc dégrader la paroi cellulaire de plusieurs mycètes qui est constituée de  $\beta$ -1,3-glucane et de chitine. Une activité lysozyme a également été observée chez certaines PR-8, les rendant donc aptes à hydrolyser les peptidoglycans de la paroi bactérienne. Les protéines PR-5 de la famille de la thaumatine ont une homologie avec la protéine permatine impliquée dans la perméabilisation de la membrane fongique. La famille PR-6 renferme des inhibiteurs de protéases qui jouent un rôle dans la défense contre les insectes et les herbivores en inhibant les protéases de leurs systèmes digestifs. Les protéines nouvellement acceptées comme protéines PR (PR-12, -13, -14) possèdent une activité anti-microbienne en agissant au niveau de la membrane plasmique du micro-organisme. Les protéines PR-10 possèdent des homologies structurelles avec des ribonucléases mais leur rôle précis reste à démontrer. La seule classe de protéine PR ne possédant aucune fonction connue à ce jour est PR-1 (Van Loon et Van Strien, 1999).

**Tableau I : Classification des protéines PR**

Famille	Activité / propriété
PR-1	Inconnue
PR-2	$\beta$ -1, 3-Glucanase
PR-3	Chitinase
PR-4	Chitinase
PR-5	Similaire à thaumatine
PR-6	Inhibiteur de protéase
PR-7	Protéase
PR-8	Chitinase
PR-9	Peroxydase
PR-10	Similaire à ribonucléase
PR-11	Chitinase
PR-12	Défensine
PR-13	Thionine
PR-14	Transfert de lipides

Selon van Loon et van Strien (1999)

### 1.3.7 La résistance systémique acquise

Suite à la réponse hypersensible, une réponse de défense « préventive » est déclenchée dans toute la plante, un phénomène appelé la résistance systémique acquise (SAR). Elle a pour but d'empêcher qu'une infection primaire prenne trop d'ampleur ou de prévenir les infections secondaires par une grande variété de micro-organismes. Cette résistance à large spectre et durable nécessite l'accumulation de l'hormone acide salicylique (SA) autant au site d'infection que dans les tissus avoisinants. En effet, les plants d'*Arabidopsis* et de tabac surexprimant le gène bactérien *NahG* qui encode une salicylate hydroxylase dégradent rapidement le SA nouvellement synthétisé et ne sont pas capables de déclencher le SAR. De plus, il a été démontré que l'application exogène de SA était suffisante pour induire le SAR (Durrant et

Dong, 2004). Il a été proposé pendant longtemps que le SA était le signal mobile passant du site d'infection vers les feuilles saines pour déclencher la résistance. Cependant, des expériences de greffes réalisées chez le tabac ont montré que le SA n'était pas ce signal mobile (Vernooij et al, 1994).

Quel est donc le rôle de l'acide salicylique ? Plusieurs protéines ont montré une certaine affinité pour le SA. Une catalase et une ascorbate peroxydase sont toutes deux inhibées par la liaison au SA, ce qui conduirait à une hausse de EAO, un messager de premier ordre pour établir la réponse de défense (Chen et al, 1993 ; Durner et Klessig, 1995). L'anhydrase carbonique SABP3 (« *Salicylic acid binding protein 3* ») possède également une affinité pour le SA et le *silencing* de SABP3 chez le tabac élimine la réponse hypersensible observée lors de l'interaction gène-pour-gène *Pto / AvrPto* (Slaymaker et al, 2002). Récemment, la protéine SABP2, laquelle possède une haute affinité pour le SA et une activité lipase stimulée par la liaison au SA, a été identifiée chez le tabac. SABP2 joue un rôle de premier plan dans la réponse de défense autant au point de vue de la réponse hypersensible qu'au niveau du SAR (Kumar et Klessig, 2003). Puisque SABP2 a une haute affinité pour le SA, il a été proposé qu'elle soit un récepteur pour le SA impliqué dans la formation d'un signal mobile d'origine lipidique responsable du déclenchement du SAR dans les tissus systémiques. Cette hypothèse est supportée par l'observation que différentes protéines importantes lors du SAR font partie de la famille des lipases / estérases, par exemple EDS1 (« *enhanced disease susceptibility* »), PAD4 (« *phytoalexin-deficient 4* ») et DIR1 (« *defective in induced resistance 1* »). Il est donc probable que ce signal mobile tant recherché soit d'origine lipidique (Wang, 2004).

Afin d'identifier les acteurs importants dans la voie du SAR, des criblages génétiques ont été effectués dans le but d'isoler des mutants d'*Arabidopsis* incapables d'induire les gènes PR suite au traitement à l'acide salicylique et

ainsi d'établir le SAR. Ces études ont conduit à l'isolation du mutant *npr1* (« *non-expressor of PR1*»). Contrairement aux plants de type sauvage qui déclenchent le SAR suite au traitement au SA ou avec un agent pathogène avirulent, le mutant *npr1* ne montre aucune protection face à une infection secondaire suite au traitement avec ces inducteurs (Cao et al, 1994). Ce n'est que 10 ans après l'isolation du mutant *npr1* que le mécanisme d'action de la protéine NPR1 commence à se clarifier. Suite à l'induction du SAR par le SA, il se produit une flambée oxydative caractérisée par la production de EAO. La cellule répond rapidement à ce stress oxydatif par l'expression de gènes reliés à la détoxification des EAO, ce qui résulte en un milieu cellulaire réducteur. C'est ce changement de potentiel redox de la cellule qui permet à NPR1 de jouer son rôle. Dans les tissus non-induits, NPR1 se trouve dans le cytoplasme sous forme d'un oligomère associé par des ponts disulfures. Après le traitement au SA, la réduction de l'environnement cellulaire engendre la dissociation de l'oligomère NPR1 en monomères pouvant être transloqués au noyau où ils peuvent servir de cofacteurs pour l'activité des facteurs de transcription TGA (voir section 1.4.1), lesquels sont impliqués dans l'expression de plusieurs gènes PR (Mou et al, 2003 ; Després et al, 2003)

### 1.3.8 Les hormones éthylène et acide jasmonique

Outre l'acide salicylique, les hormones éthylène (ET) et acide jasmonique (JA) sont également impliquées dans la réponse de défense. Des mutants d'*Arabidopsis* affectés dans la synthèse (*fad3/fad7/fad8* : « *fatty acid desaturase* ») ou dans la perception/signalisation de l'acide jasmonique (*coi1* : « *coronatine insensitive* », *jar1* : « *jasmonic acid resistant 1* ») sont plus susceptibles aux agents pathogènes nécrotrophes tels *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Pythium sp* et *Erwinia carotovora*. Le mutant *ein2* (« *ethylene insensitive2* »), qui est affecté dans la signalisation de l'ET, montre une susceptibilité à ces mêmes agents pathogènes mais une plus grande

résistance aux agents pathogènes virulents *Pseudomonas syringae* et *Xanthomonas campestris*. Le rôle que peut avoir l'éthylène dans la réponse de défense est donc nuancé. Le JA et l'ET sont également connus pour agir de concert et sont tous deux requis pour l'expression des gènes de défense *PDF1.2* (« *PLANT DEFENSIN1.2* »), *HEL* (« *HEVEIN LIKE* ») et *CHIB* (« *CHITINASEB* »). De plus, des analyses d'expression globale des gènes ont montré que près de la moitié des gènes induits par l'ET l'étaient également par le JA. La voie de signalisation du JA/ET est également impliquée dans une forme de résistance systémique induite (ISR), laquelle est SA-indépendante et déclenchée par les bactéries du sol capables de coloniser les racines des plantes (Kunkel et Brooks, 2002).

Les voies du SA et du JA/ET ne sont pas indépendantes et s'influencent à la manière d'antagonistes lors de la réponse de défense. Par exemple, la MAPK d'*Arabidopsis* MPK4 réprime les défenses SA-dépendantes mais est nécessaire pour l'expression de gènes connus comme étant JA-dépendants (Petersen et al, 2000). Également, il a été démontré récemment que le régulateur du SAR NPR1 est impliqué dans l'effet antagoniste de la voie du SA sur celle du JA et que ce phénomène serait rempli par une fonction cytoplasmique de NPR1 plutôt que nucléaire (Spoel et al, 2003).

### **1.3.9 Implication de la lumière et des chloroplastes dans la réponse de défense**

Les modèles de défense chez les plantes ont souvent été posés à partir de ceux des mammifères. Pour cette raison, les fonctions que pourraient potentiellement remplir la lumière et les chloroplastes n'ont été considérées que très rarement. Ce n'est que très récemment que ces deux facteurs ont été considérés dans des mécanismes de défense contre les agents pathogènes.

Genoud et al (2002) ont démontré que la lumière est un élément très important pour la réponse de défense dépendante du SA chez *Arabidopsis*. En effet, l'expression du marqueur du SAR *PR-1* est induite par le SA seulement en présence de lumière et serait sous le contrôle des phytochromes A et B, une famille de photorécepteurs. La réponse hypersensible et la résistance à l'agent pathogène *P. syringae* DC3000 *AvrRpt2* sont également réduites dans l'obscurité et dans les mutants *phyA* et *phyB* dans lesquelles la perception de la lumière par le phytochrome A et B, respectivement, est éliminée. Cependant, même si ces phénomènes sont dépendants de la lumière, il semble que seulement la réponse hypersensible dépende de la présence de chloroplastes fonctionnels alors que l'expression de *PR-1* serait indépendante. Les auteurs suggèrent que les EAO produits par l'appareil photosynthétique du chloroplaste seraient impliqués dans le processus de la flambée oxydative lors de la réponse hypersensible.

Plusieurs autres évidences indiquent une fonction importante du chloroplaste lors de la réponse de défense. Par exemple, la synthèse du SA nécessaire pour déclencher le SAR se fait presque entièrement dans le chloroplaste par l'isochorismate synthase (Wildermuth et al, 2001). L'enzyme iNOS responsable de la synthèse du messenger oxyde nitrique serait probablement localisée aux chloroplastes également (Wendehenne et al, 2004). Le chloroplaste serait alors le site de synthèse de deux molécules extrêmement importantes pour l'immunité des plantes.

Le transport d'électrons photosynthétiques (TEP) par le photosystème II (PSII) et le photosystème I (PSI) pourrait être impliqué dans la réponse de défense. Abbink et al (2002) ont démontré que le *silencing* d'un gène encodant une sous-unité du PSII et le traitement au 3-(3,4)-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée (DCMU), un inhibiteur du transport d'électrons du PSII, affectent la résistance du tabac au virus de la mosaïque du tabac. L'inhibition du TEP par

le DCMU affecte également l'expression du gène nucléaire *ASCORBATE PEROXYDASE 2* (APX2) lors de la réponse aux blessures chez *Arabidopsis*. Il est donc clair que la photosynthèse peut avoir un impact sur l'expression de gènes nucléaires reliés aux stress (Chang et al, 2004).

## 1.4 Les facteurs de transcription

La reconnaissance de l'agent pathogène par la plante se produit généralement à la membrane plasmique ou dans le cytoplasme et déclenche une multitude de voies de signalisation. Plusieurs de ces signaux convergent vers le noyau où ils conduisent à l'activation de la transcription de plusieurs gènes reliés à la réponse de défense ou à différents stress. Des études d'expression globale des gènes montrent que c'est par milliers que les gènes répondent à la présence d'agents pathogènes ou d'hormones impliquées dans la réponse de défense (résumé dans Katagiri, 2004). La reprogrammation du transcriptome associée à la réponse de défense est un phénomène complexe impliquant plusieurs classes de facteurs de transcription dont les TGA/OBF, les WRKY et les ERF.

### 1.4.1 Les TGA/OBF

Les facteurs de transcription de la classe TGA/OBF font partie de la famille des bZIP, laquelle comprend 75 membres chez *Arabidopsis thaliana*. Les bZIP sont impliqués dans une multitude de phénomènes tels la réponse de défense, le développement des fleurs, la maturation des graines et la signalisation de la lumière. Le domaine bZIP est formé de deux motifs structuraux localisés sur une même hélice  $\alpha$ , une région basique de liaison à l'ADN responsable également de la localisation nucléaire et un zipper de leucine pour la dimérisation (Jakoby et al, 2002). Les facteurs de transcription bZIP lient préférentiellement des séquences d'ADN palindromique comme la



boîte A (TACGTA), la boîte C (GACGTC) et la boîte G (CACGTG ; Izawa et al, 1993).

Le génome d'*Arabidopsis* encode 10 protéines de la classe des TGA/OBF (Jakoby et al, 2002). Ces facteurs de transcription lient les éléments *as-1/ocs* ou *as-1 like* retrouvés dans le promoteur de plusieurs gènes induits lors de la réponse de défense tels *PR-1* et *GST6* (Lebel et al, 1998 ; Chen et Singh, 1999). La plupart des facteurs TGA peuvent interagir avec le régulateur du SAR NPR1, ce qui leur conférerait un rôle clé dans la réponse de défense. Contrairement aux TGA2, 3, 5, 6, 7 qui interagissent directement avec NPR1 en double-hybrides, les TGA1 et 4 peuvent s'associer à NPR1 seulement suivant la réduction de leurs ponts disulfures, laquelle est dictée par le changement SA-dépendant du potentiel redox de la cellule (Zhou JM et al, 2000; Després et al, 2003). Il a été démontré pour TGA1 et TGA2 que cette interaction avec NPR1 augmente leur activité de liaison à l'ADN (Després et al, 2000 ; Després et al, 2004). Des preuves directes de l'implication des TGA dans l'expression des gènes *PR* et la réponse de défense ont été difficiles à obtenir probablement à cause de la redondance entre les différents membres de la famille. Cependant, l'utilisation du triple knockout *tga2 tga5 tga6* a montré que l'induction de *PR-1* et du SAR par le SA dépendait grandement de l'activité de ces trois TGA (Zhang et al, 2003).

#### 1.4.2 Les WRKY

Les WRKY constituent une nouvelle famille de facteurs de transcription qui est sureprésentée chez les plantes. A ce jour, 74 WRKY ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana*. Les protéines WRKY contiennent toutes le domaine WRKY, lequel est composé d'environ 60 acides aminés et qui comprend le motif conservé WRKYGQK et un nouveau type de doigt de zinc responsable de la liaison à l'ADN. Les WRKY peuvent être classés en 3 groupes selon le

nombre de domaine WRKY qu'ils possèdent et la structure de leurs doigts de zinc. Les WRKY du groupe I contiennent deux doigts de zinc et ceux du groupe II n'en contiennent qu'un seul. Ces deux groupes ont généralement le type de doigt de zinc C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> (C-X<sub>4-5</sub>-C-X<sub>22-23</sub>-H-X<sub>1</sub>-H). Les WRKY du groupe III sont beaucoup plus rares et diffèrent du groupe I et II par la structure de leur doigt de zinc de type C<sub>2</sub>-HC (C-X<sub>7</sub>-C-X<sub>22</sub>-H-X<sub>1</sub>-C). À l'extérieur du domaine WRKY, les protéines WRKY sont assez divergentes (Euglem et al, 2000).

Les WRKY reconnaissent et lient la boîte W (T)(T)TGAC(C/T), laquelle est retrouvée dans le promoteur de plusieurs gènes reliés à la réponse de défense. En effet, Maleck et al (2000) ont démontré par *microarrays* que des 26 gènes qui étaient induits sous toutes les conditions déclenchant le SAR, tous contenaient au moins une boîte W dans leur promoteur. De plus, l'expression du régulateur du SAR NPR1 est également sous le contrôle d'un WRKY, ce qui démontre le rôle clé que pourraient jouer les WRKY durant le SAR (Yu et al, 2001). L'expression des gènes *WRKY* est elle-même régulée lors de la réponse de défense. Chez *Arabidopsis*, des 72 gènes *WRKY* testés, 49 répondent à l'infection par *P. syringae* ou au traitement au SA (Dong et al, 2003). Certains gènes *WRKY* sont eux-mêmes sous le contrôle de WRKY, c'est le cas par exemple de AtWRKY6 et AtWRKY18 qui montrent une autorégulation négative (Robatzek et Somssich, 2002 ; Chen et Chen, 2002).

L'importance des WRKY lors de la réponse de défense se clarifie de plus en plus. Les WRKY AtWRKY22 et AtWRKY29 sont tous deux des composants de la signalisation d'une MAPK qui confère la résistance aux agents pathogènes bactériens et fongiques chez *Arabidopsis* (Asai et al, 2002). Également, la surexpression de AtWRKY18 ou de AtWRKY70 conduit à une résistance accrue à l'infection par certains agents pathogènes (Chen et Chen, 2002 ; Li et al, 2004). D'autres WRKY ont aussi été impliqués dans la régulation de gènes *PR* chez le persil, le tabac et le maïs (résumé dans Rushton et

Somssich, 1998). Récemment, un domaine WRKY a été retrouvé dans le gène *R RESISTANCE TO RALSTONIA SOLANACEARUM1* (*RRS1-R*) qui confère la résistance à l'agent pathogène *Ralstonia solanacearum* chez *Arabidopsis*. *RRS1-R* encode une protéine de résistance de type TIR-NB-LRR qui interagit directement avec le produit du gène *Avr PopP2* de *Ralstonia solanacearum* et localise au noyau. C'est ici le premier exemple d'un WRKY pouvant à la fois servir de gène *R* et de facteur de transcription, quoique cette dernière hypothèse reste à confirmer (Deslandes et al, 2003).

### 1.4.3 Les ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERF)

Les ERF font partie de la grande famille de facteurs de transcription APETALA2 (AP2)/ERF. Ils partagent tous un domaine ERF de 58-59 acides aminés responsable de la liaison aux boîtes GCC (AGCCGCC), lesquelles sont caractérisées comme étant des éléments de réponse à l'éthylène, une hormone rapidement synthétisée lors de l'attaque d'agents pathogènes. Ces éléments sont souvent présents dans le promoteur de gènes *PR* et de gènes induits par le ET ou le JA. L'activité de plusieurs ERF semble être régulée au niveau transcriptionnel suite à l'infection par des agents pathogènes virulents et avirulents, le traitement au ET, JA et SA et lors de la réponse aux blessures (Gutterson et Reuber, 2004). D'autres ERF sont régulés par phosphorylation tels *Pti4* chez la tomate et *OsEREBP1* chez le riz, suggérant ainsi un mécanisme de régulation conservé chez les ERF (Gu et al, 2000 ; Cheong et al, 2003).

L'importance des ERF lors de la réponse de défense a souvent été démontrée par la surexpression de ceux-ci dans des plantes transgéniques. La surexpression de l'ERF *Pti4* chez *Arabidopsis* mène à l'expression constitutive de certains gènes *PR* et à une résistance accrue à l'infection par l'agent pathogène fongique *Erysiphe orontii* et par la bactérie *P. syringae* (Gu et al,

2002). Curieusement, la surexpression de *ERF1* chez *Arabidopsis* cause une augmentation de la résistance à deux agents pathogènes nécrotrophes mais une plus grande susceptibilité à *P. syringae* (Berrocal-Lobo et al, 2002). La surexpression de deux ERF différents peut donc avoir des effets différents sur la résistance à un agent pathogène donné. Il est fort possible que l'action des ERF sur la réponse de défense nécessite l'implication d'autres facteurs de transcription. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine réalisées par Chakravarthy et al (2003) ont démontré que Pti4 pouvait se lier à des promoteurs ne possédant pas de boîtes GCC. Les auteurs suggèrent que Pti4 pourrait avoir un effet sur ces promoteurs via l'association avec d'autres facteurs de transcription. Une interaction protéine-protéine entre l'ERF AtEBP et un facteur de transcription bZIP a déjà été répertoriée chez *Arabidopsis* (Buttner M et Singh, 1997).

## 1.5 Les facteurs de transcription Whirly

Les travaux effectués au laboratoire du Dr Normand Brisson ont conduit à la découverte d'une famille de facteurs de transcription impliquée dans la réponse de défense chez les plantes : les Whirly. Les Whirly forment une nouvelle famille de régulateurs transcriptionnels spécifiques au règne végétal. Ils lient l'ADN simple brin (ADNsb) et possèdent une structure tridimensionnelle unique. Dans les prochaines pages de ce mémoire, je ferai un bref historique des différentes étapes qui ont mené à cette découverte.

### 1.5.1 L'interaction *Phytophthora infestans* – Pomme de terre

L'oomycète *P. infestans* est un agent pathogène extrêmement dangereux pour le règne végétal et son interaction avec la pomme de terre est connue pour être dévastatrice, occasionnant souvent la perte entière de récoltes. Même si l'interaction *P. infestans* – pomme de terre est généralement

compatible (infection et maladie), certaines races de cet agent pathogène diffèrent légèrement d'un point de vue génétique et donnent lieu à une interaction incompatible (résistance), laquelle est caractérisée par une réponse hypersensible aux sites d'infection. Cette réponse peut également être induite chez les tubercules par le traitement à l'acide arachidonique, un acide gras synthétisé par *P. infestans* qui peut servir comme éliciteur de la réponse de défense (Bostock et al, 1981).

### 1.5.2 Induction de *PR-10a* chez la pomme de terre

Il a été observé que l'expression de *PR-10a* (anciennement *STH-2*) était fortement induite suite au traitement de tubercules de pomme de terre à l'acide arachidonique et lors de la réponse aux blessures (Matton et Brisson, 1989). L'accumulation de la protéine *PR-10a* est également stimulée par le traitement de tubercules avec une souche virulente ou avirulente de zoospores de *P. infestans*. Cependant, l'accumulation de *PR-10a* est plus rapide lors de l'inoculation de tubercules avec la souche avirulente de l'agent pathogène (celle qui ne cause pas la maladie). Une corrélation peut donc être tirée entre la résistance de la plante à l'infection et la cinétique d'induction de *PR-10a* (Constabel et Brisson, 1992).

Une fonction claire n'a pas encore été attribuée à la protéine *PR-10a*. Certaines études ont tout de même démontré que des homologues de *PR-10a* possédaient une activité ribonucléase (Moisevey et al, 1994). Il a été suggéré qu'un homologue de *PR-10a*, l'allergène Bet v 1 du pollen de bouleau, pourrait lier des stéroïdes (Markovic-Housley et al, 2003). L'activité ribonucléase et la liaison aux stéroïdes n'ont toujours pas été intégrée dans un modèle de réponse de défense.

### 1.5.3 Éléments *cis* de régulation du promoteur de *PR-10a*

Puisque l'expression du gène *PR-10a* semblait strictement régulée par l'élicitation, la réponse aux blessures et par l'interaction avec *P. infestans*, ceci a amené le laboratoire à étudier les éléments *cis* de régulation du promoteur de *PR-10a*. Une construction chimérique comprenant le premier kilobase du promoteur de *PR-10a* fusionné au gène rapporteur GUS ( $\beta$ -glucuronidase) a été utilisée pour réaliser des analyses fonctionnelle. Ces analyses ont démontré la présence de deux éléments *cis* de régulation (Matton et al, 1993). L'élément de réponse à l'éliciteur (ERE) est une région activatrice située de -135 à -105 et est nécessaire pour l'activation du promoteur lors du traitement à l'éliciteur. Un élément de régulation négative, le SE (« *silencing element* »), a également été identifié entre -52 et -27. Des études par retardement sur gel ont ensuite démontré que chacune de ces régions interagissait avec des facteurs *trans*. La facteur PBF-2 (« *PR-10a binding factor2* ») se lie au ERE de façon stress-dépendante et le répresseur SEBF (« *silencing element binding factor* ») se lie à la région SE de régulation négative (Després et al ,1995; Boyle et Brisson, 2001).

### 1.5.4 Le facteur nucléaire PBF-2

PBF-2 montre une spécificité de liaison à la forme simple brin de l'ERE et sa liaison à l'ADNsb corrèle avec l'activation du promoteur *PR-10a* suggérant que PBF-2 est un activateur transcriptionnel (Desveaux et al, 2000). L'étude détaillée du ERE a permis d'identifier la séquence minimale permettant l'induction de *PR-10a*. Cet élément a été nommé boîte PB (« *PBF-2 Binding* ») et est formé de la séquence GTCAAAA(AT) (Desveaux et al, 2004). Des études d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que PBF-2 est associé *in vivo* au promoteur de *PR-10a* seulement en situation de stress, ce

qui est en corrélation avec les résultats obtenus par retardement sur gel (Desveaux et al, 2004).

PBF-2 est formé d'un tétramère d'une seule protéine de 24 kDa nommée StWhy1 (*Solanum tuberosum Whirly 1*, anciennement p24), laquelle possède des homologues à travers tout le règne végétal (Desveaux et al, 2000). StWhy1 possède une région polyglutamine retrouvée chez plusieurs activateurs transcriptionnels et capable de transactiver l'expression des gènes chez les mammifères et les plantes (Gerber et al, 1994 ; Schwechheimer et al, 1998). Il a été démontré que la région polyQ de StWhy1 était effectivement un domaine d'activation de la transcription (Desveaux et al, 2004). La structure cristalline de StWhy1 a été résolue à une résolution de 2.3 Å. L'assemblage des protomères de StWhy1 produit une structure quaternaire homotétramérique possédant un aspect de moulin à vent (« *whirligig* » en anglais) qui serait conservée chez tous les homologues de StWhy1, inspirant ainsi le nom de « Whirly » pour classer cette nouvelle famille de facteurs de transcription (Desveaux et al, 2002; Figure 8).

Même si StWhy1 a une masse moléculaire de 24 kDa dans les noyaux de cellules de pommes de terre, son ARNm encode une protéine prédite à une masse moléculaire de 30 kDa, ce qui suggère que StWhy1 doit être clivée en une forme mature de 24 kDa *in vivo* (Desveaux et al, 2000). La région N-terminale de StWhy1 possède les caractéristiques d'un peptide transit. Les peptides transit sont généralement clivés suite à l'importation aux chloroplastes. La fusion de StWhy1 à la *Green Fluorescent Protein* (GFP) a démontré que StWhy1 a une double localisation nucléaire et chloroplastique. Le mécanisme qui permet cette double localisation est encore inconnu (Joyeux et Brisson, résultats non-publiés).

### 1.5.5 Rôle des Whirly lors de la réponse de défense \*

Chez *Arabidopsis*, la liaison à l'ADNsb du Whirly AtWhy1 (*Arabidopsis thaliana* Whirly 1), le Whirly d'*Arabidopsis* le plus similaire à StWhy1, est activée suivant le traitement des plantes à l'acide salicylique dans un mécanisme NPR1 indépendant. De plus, il a été observé que l'élément PB GTCAAAA(A/T) est enrichi dans les promoteurs de gènes induits lors du SAR. Le rôle des Whirly lors de la réponse de défense a donc été étudié à l'aide de deux mutants TILLING (« *Targeting Induced Local Lesions IN Genomes* » ; Colbert et al, 2001) d'*Arabidopsis thaliana* possédant chacun une mutation ponctuelle dans la séquence codante du Whirly AtWhy1. Ces deux mutants, nommés *atwhy1.1* et *atwhy1.2*, montrent une plus faible activité de liaison à l'ADNsb, une réduction de l'expression de *PR-1* suite au traitement au SA, une diminution de la résistance à *Peronospora parasitica* et l'abolition de la résistance systémique acquise. Ces résultats donnent une importance capitale à cette protéine Whirly lors de la réponse de défense chez *Arabidopsis* (Desveaux et al, 2004).

### 1.5.6 Régulation de l'activité de StWhy1

Des études tant *in vitro* (retardement sur gel) que *in vivo* (immunoprécipitation de la chromatine) ont montré que la capacité de StWhy1 à lier son élément d'ADN n'était présente qu'en situation de stress (Després et al, 1995; Desveaux et al, 2004). De plus, il a été prouvé que StWhy1 était entreposé sous forme inactive dans les tissus non-stressés et que l'activation de sa liaison à l'ADN suite à différents stress n'était pas due à sa synthèse *de novo* (Desveaux et al, 2000). Ceci suggère donc que la forme inactive de StWhy1 entreposée dans les noyaux doit être activée aux moments opportuns pour lier l'ADN. L'activation de la liaison à l'ADN de StWhy1 lors de la réponse

---

\* Une partie de ces travaux seront présentés à la Section 3



de défense se ferait via la phosphorylation directe de la protéine dans une voie de signalisation qui impliquerait un homologue de la protéine kinase C (PKC) des mammifères (Després et al, 1995; Subramaniam et al, 1997). Curieusement, le passage d'extraits nucléaires de tubercules non-stressés sur une résine Q-sépharose permet de découvrir une activité de liaison à l'ADN de StWhy1 comparable à celle observée dans des extraits nucléaires de tubercules élicités, ce qui est une évidence que StWhy1 est entreposé sous forme inactive dans les noyaux (Desveaux et al, 2000).

### 1.5.7 Hypothèse et objectifs et du projet

À la lumière des résultats présentés à la section précédente, nous pouvons émettre l'hypothèse que StWhy1 interagirait avec une protéine qui inhiberait sa liaison à l'ADN dans les tissus non-stressés. L'association avec cet inhibiteur serait rompue lors de la réponse de défense et lors du passage d'un extrait nucléaire sur une résine Q-Sépharose, permettant ainsi à StWhy1 de lier l'ADN. Dans l'espoir de purifier cet inhibiteur, nous utiliserons la méthode de purification d'affinité en tandem (TAP; Puig et al, 2001). La méthode TAP permet la purification de complexes protéiques dans des conditions physiologiques et l'identification de chacun de ses constituants par spectrométrie de masse. Ce projet sera réalisé chez l'organisme modèle *Arabidopsis thaliana* puisque son génome est entièrement séquencé, ce qui facilite l'identification des interacteurs repêchés par TAP. Avant de commencer la méthode TAP, nous devons nous assurer que le Whirly AtWhy1, l'orthologue de StWhy1 chez *Arabidopsis thaliana*, possède un modèle de régulation de son activité de liaison à l'ADN semblable à celui de StWhy1 et que la protéine de fusion AtWhy1-TAP est active et fonctionnelle dans la plante.

Pour mieux comprendre la fonction des Whirly chez *Arabidopsis*, les mutants *atwhy1.1* et *atwhy1.2* possédant chacun une mutation ponctuelle dans

la séquence codante du gène *AtWhy1* seront caractérisés en deuxième partie de ce mémoire. L'activité de liaison à l'ADN des protéines mutantes *atwhy1.1* et *atwhy1.2* sera évaluée à partir d'extraits nucléaires des plants mutants *atwhy1.1* et *atwhy1.2* et à partir des protéines *atwhy1.1* et *atwhy1.2* recombinantes purifiées. De plus, en se basant sur des observations structurelles, nous tenteront de démontrer que la protéine mutante *atwhy1.2* ne forme pas de tétramère, ce qui affecterait la stabilité et l'accumulation de la protéine dans la plante.

## 2.0 Matériel et méthodes

Toutes les méthodes standard de biologie moléculaire ont été effectuées selon Sambrook et al (1989).

### 2.1 Matériel végétal et croissance des plantes

*Arabidopsis thaliana* écotype Col-0 a été obtenu du laboratoire du Dr Jeff Dangl (University of North Carolina, Chapel Hill). Les mutants d'*Arabidopsis* pour le gène *AtWhy1* (at1g14410) ont été obtenus du *Arabidopsis TILLING Project* tel que décrit dans Desveaux et al (2004). Les plantes ont poussé dans une chambre de culture à une température de 21°C et 40% d'humidité relative sous ensoleillement prolongé (16 heures de lumière, 8 heures d'obscurité). Le terreau utilisé est composé de 4 volumes de ProMix pour semis, 2 volumes de sable et 1 volume de vemiculite.

### 2.2 Traitement des plantes

Pour le traitement à la dexaméthasone (DEX, Sigma), des plants d'*Arabidopsis* âgés de 3 à 4 semaines ont été traités en vaporisant une solution de 20  $\mu$ M DEX 0.02% Silwet L-77 (Lehle Seeds) 24 à 48 heures avant l'extraction des protéines ou autres traitements. Une procédure similaire a été employée lors du traitement à l'acide salicylique (1 mM acide salicylique 0.02% Silwet L-77).

### 2.3 Fractionnement cellulaire

Cinq g de plants d'*Arabidopsis* induits au DEX pendant 24 heures ont été broyés dans l'azote liquide en utilisant un pilon et un mortier. La poudre ainsi obtenue a été solubilisée dans 20 mL de tampon NEBH (1M hexylène glycol,

20 mM 2-mercaptoéthanol, 10 mM Pipes-KOH pH 6.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM spermidine, 0.15 M spermine). L'homogénat a ensuite été filtré sur 2 couches de Miracloth (Calbiochem) puis centrifugé à 6000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot a été resuspendu dans 500 µL de NEBH contenant 1% NP40, incubé 15 minutes sur glace pour lyser les chloroplastes et centrifugé à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été conservé comme extrait chloroplastique. Le culot contenant les noyaux a été lavé 5 fois avec 10 mL de NEBH 1% NP40 et resuspendu dans 200 µL de tampon IPP150 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% NP40). Les noyaux ont été lysés par sonication puis centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant a été conservé comme extrait nucléaire.

## 2.4 Retardement sur gel

Les expériences de retardement sur gel ont été effectuées selon Desveaux et al (2004). Globalement, les extraits protéiques (dans le tampon IPP150) ont été incubés 15 minutes sur glace en présence de 30 000 cpm de sonde

	4xPB	simple	brin	(5' <sup>32</sup> P
--	------	--------	------	---------------------

TTTTTGTCATTTTTGTCATTTTTGTCATTTTTGTCATTTT 3') dans un volume final de 50 µL. Cette sonde est formée par la répétition de 4 éléments PB modifiés (GTCATTTT). Lorsque indiqué, les extraits protéiques ont été incubés sur glace pendant une heure en présence de formamide avant d'effectuer la réaction de liaison à la sonde radioactive. Les échantillons ont ensuite été chargés sur gel non-dénaturant 5.7% polyacrylamide puis la migration s'est faite à 150 V pendant 3 heures à 4°C. Le gel a été exposé durant une nuit à -80°C sur des films Kodak X-Omat AR.

## 2.5 Chromatographie sur Q-Sépharose

La chromatographie sur Q-Sépharose des extraits nucléaires d'*Arabidopsis* a été faite selon Desveaux et al (2000).

## 2.6 Construction *pDEX AtWhy-TAP*

L'ADNc de *AtWhy1* a été amplifié par RT-PCR. L'extraction des ARNm à partir de feuilles d'*Arabidopsis* s'est faite à l'aide du Trizol (Invitrogen). La synthèse des ADNc a été effectuée avec le système RevertAid (Fermentas) et l'amplification par PCR à l'aide de l'enzyme *Pwo* (Roche). Les amorces suivantes ont été utilisées pour le PCR : 5'-CAAACAGATATCGATGTCGCAACTCTTATC-3' et 5'-TAAGATCTGCAGTGTATTCCATTCATAGTC-3'. La première amorce insère un site EcoRV et la seconde un site PstI (soulignés sur les séquences). Ces deux sites de restriction ont permis le clonage du produit de PCR dans le vecteur pBluescript (Stratagene).

L'étiquette TAP a été amplifiée par PCR à partir du vecteur pBS1479 (Puig et al, 2001) avec les amorces 5'-CCCTCACTGCAGGGAACAAAAGCTGG-3' et 5'-TCGATAACTAGTTTCAGGTTGACTTCC-3'. La première amorce insère un site PstI et la seconde un site SpeI (soulignés sur les séquences). Ces deux sites de restriction ont permis le clonage du produit de PCR en fusion traductionnelle avec l'ADNc de *AtWhy1* dans pBluescript. La construction *AtWhy1-TAP* a finalement été sous-clonée dans le vecteur pDEX aux sites de restriction StuI-SpeI. Ce vecteur de transformation basé sur le vecteur pTA7002 (Aoyama et al, 1997) a été obtenu du Dr Nam-Hai Chua (Rockefeller University, New York).

## 2.7 Transformation des plantes par *Agrobacterium* et sélection

La souche *Agrobacterium tumefaciens* GV1301 a été transformée avec la construction *pDEX AtWhy1-TAP* par électroporation selon Weigel et Glazebrook (2002). Les plantes ont été transformées par la technique d'immersion florale décrite par Clough et Bent (1998). Les transformants ont été sélectionnés selon la résistance à l'herbicide BASTA (McDowell et al, 1998).

## 2.8 Extraction rapide des protéines à partir de feuille

De 100 à 200 mg de feuilles d'*Arabidopsis* ont été broyées dans un tube Eppendorf à l'aide d'un pilon en présence de tampon d'extraction (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1% SDS) à raison de 1 mL de tampon par gramme de feuille. L'homogénat ainsi obtenu a été incubé 5 minutes sur glace en vortexant occasionnellement puis centrifugé à 12000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant a été récolté, transféré dans un autre tube Eppendorf et centrifugé à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Ce surnageant a été utilisé comme extrait total.

## 2.9 Purification d'affinité en tandem

De 15 à 25 g de plants d'*Arabidopsis* âgés de 4 semaines ont été broyés dans l'azote liquide en utilisant un pilon et un mortier. La poudre ainsi obtenue a été solubilisée dans 50 mL de tampon NEBH. L'homogénat a ensuite été filtré sur 2 couches de Miracloth (Calbiochem) puis centrifugé à 6000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot a été resuspendu dans 10 mL de tampon IPP150 contenant 1 mM phénylméthylsulphonylfuorure et un cocktail d'inhibiteurs de protéases Complete (Roche). Les noyaux ont été lysés par sonication puis centrifugés à 12000 g pendant 45 minutes à 4°C. Le surnageant a été conservé pour la purification. La purification d'affinité en tandem s'est faite selon Puig et

al (2001) à l'exception que la digestion à la protéase TEV (Invitrogen) a eu lieu à 4°C pendant 16 heures.

Les fractions purifiées ont été concentrées à un volume final de 50 µL à l'aide des concentrateurs Biomax 10K 0.5 mL (Millipore). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE 12% selon Laemmli (1970) puis visualisées par coloration à l'argent selon Mortz et al (2001). L'identification des protéines par spectrométrie de masse LC/MS/MS a été faite au Centre protéomique de l'est du Québec (Sainte-Foy, Québec) sur un appareil LCQ Deca XP (Thermo Finnigan).

## **2.10 Clonage de *AtWhy1* et des gènes mutés *atwhy1.1* et *atwhy1.2* pour expression dans *E. coli***

Les ADNc de *AtWhy1* et des mutants *atwhy1* ont été clonés par RT-PCR d'une façon similaire à celle décrite précédemment. Pour le clonage des mutants, les ARNm ont été isolés à partir des plants TILLING d'*Arabidopsis*. Les amorces suivantes ont été utilisées pour le PCR : 5'-AAGACGCATATGCTCTTCTCGGTAAAGTCTCGC-3' et 5'-TAAGATTGCGGCCGCATTCCATTCATAGTCTCCTCCATAG-3'. La première amorce insère un site NdeI et la seconde un site NotI (soulignés sur les séquences). Ces deux sites de restriction ont permis le clonage du produit de PCR dans le vecteur pET-21a (Novagen) en fusion traductionnelle avec une étiquette His en C-terminale. La construction a ensuite été transformée dans la souche d'expression BL21 pLysS (Novagen) pour la production des protéines recombinantes.

### **2.11 Expression des protéines recombinantes dans *E. coli* et purification**

L'expression des protéines AtWhy1 et atwhy1.1 a été induite selon Desveaux et al (2000). Pour, la protéine mutante atwhy1.2, 250 mL de milieu Luria-Broth contenant 1 mM d'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside ont été ensemencés avec 5 mL d'une préculture bactérienne. L'induction des protéines s'est faite à 13°C pendant 72 heures avec agitation. La purification des protéines recombinantes sur colonne de nickel s'est faite selon Desveaux et al (2000).

### **2.12 Filtration sur gel**

La filtration sur gel a été effectuée sur un FPLC (Amersham) en utilisant une colonne Superose 12 (Amersham) préalablement équilibrée avec le tampon IPP150. Un mg d'un extrait cellulaire de *E. coli* provenant d'une souche BL21 pLysS (Novagen) exprimant AtWhy1 ou atwhy1.2 a été injecté sur la colonne et des fractions de 1 mL ont été collectées à un débit de 0.5 mL / minute. Trente  $\mu$ L de chaque fraction ont été analysés par immunobuvardage.

### **2.13 Immunobuvardage**

Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE 12% selon Laemmli (1970) puis électrotransférées sur membrane de nitrocellulose (Pharmacia). L'immunobuvardage s'est fait selon une procédure standard en utilisant les anticorps polyclonaux de lapin anti-AtWhy1 à une dilution 1:1000 (Maréchal et Brisson, non-publié), anti-PR1 à une dilution 1:5000 (Kliebenstein et al, 1999), anti-cdc2 à une dilution 1:1000 (Santa Cruz), anti-RCA à une dilution 1:1000 (Zhang et al, 2002) ou anti-PSI-D à une dilution 1:10 000 (Haldrup et al, 2003). Le système de détection ECL (Pharmacia) a été utilisé pour la révélation des immunobuvardages.



## 3.0 Résultats

### 3.1 Identification des interacteurs de AtWhy1 par purification d'affinité en tandem

#### 3.1.1 La famille Whirly chez *Arabidopsis thaliana*

Le génome d'*Arabidopsis thaliana* étant complètement séquencé, il nous a été possible d'identifier les homologues de la protéine StWhy1 chez cette plante modèle. Trois membres de la famille des Whirly ont été identifiés : AtWhy1 (at1g14410), AtWhy2 (at1g71260) et AtWhy3 (at2g02740). La figure 1 montre un alignement de séquences en acides aminées entre StWhy1 et les 3 Whirly d'*Arabidopsis*. De ces trois membres, c'est AtWhy1 qui a le plus d'identité de séquence à StWhy1 avec 68%. AtWhy2 et AtWhy3 possèdent respectivement 47% et 58% d'identité à StWhy1. AtWhy1 et AtWhy3 sont les membres de la famille Whirly chez *Arabidopsis* qui ont le plus d'identité avec 78%. Quant à AtWhy2, il est plus distant ayant 40% d'identité à AtWhy1 et 42% d'identité à AtWhy3. Les trois Whirly d'*Arabidopsis* contiennent des résidus identifiés chez StWhy1 comme étant essentiels pour la liaison à l'ADN soient KGKAAL (résidus 100 à 105), YDW (résidus 143 à 145) et la lysine 188. Tout porte à croire que les Whirly d'*Arabidopsis* pourraient donc lier l'ADN.

#### 3.1.2 Liaison à l'ADN des Whirly chez *Arabidopsis thaliana*

Tout d'abord, il est primordial d'évaluer si les Whirly d'*Arabidopsis* se comportent de façon similaire au Whirly prototypique StWhy1 de la pomme de terre. Des extraits nucléaires de feuilles d'*Arabidopsis* ont donc été préparés et l'activité de liaison à la sonde 4xPB des Whirly a été observée par retardement sur gel. Cette sonde d'ADN simple brin est formée par la répétition de 4 éléments PB modifiés (GTCATTTT) et est liée avec environ 10 fois plus

**Figure 1 : La famille des Whirly chez *Arabidopsis thaliana***

Alignement de séquence de la protéine StWhy1 de pomme de terre et des trois membres de la famille Whirly chez *Arabidopsis thaliana* : AtWhy1 (at1g14410), AtWhy2 (at1g71260) et AtWhy3 (at2g02740). Les résidus identiques sont encadrés en noirs et les résidus similaires en gris. La séquence protéique consensus obtenue est indiquée au bas de l'alignement. La numérotation des résidus correspond à la séquence protéique de StWhy1. L'alignement a été réalisé à l'aide du programme ClustalW (Thompson et al, 1994) puis modifié manuellement par la suite.

	1	10	20	30	40	50	
StWhy1	MSNFSLSPSP	TSGFSLNLQ	NPTKTSYLS	FSSSINTI	APLSSNTT	KSFSGLTH	KAAALP
AtWhy1	MS..QLLST	PLMAVN.....	SNPRFLSS	.SV	VTGGFAV	KRHGFALK	PTTKTV
AtWhy2		MKQARSL	LSRSLCDQ	SKS...L	FEASTLRG	ASWSNS	STPGRGF
AtWhy3	MS..QLLSP	PPMAVFSK	TFINHKFS	DARFLSS	.SI	TSGGFAG	K..IIP
Consensus				F S			
	60	70	80	90	100	110	
StWhy1	RNLSLTCR	HSDFEF	EQQQQQQQ	QQP.QG	ASTP	KVVGYSI	KGKAAL
AtWhy1	KLFSVKSR	QTDYFE	KQRFQD	SSSSP	SPAEGLP	ARFYGH	SIKGKAAL
AtWhy2	.....			SG	RLTAPY	SIKGKAAL	VEPVL
AtWhy3	LKLTVKSR	QSDYFE	KQRFQD	SSSSQN	.AEVSSP	KVVGHSI	KGKAAL
Consensus						SI KGKAAL	P P F
	120	130	140	150	160	170	
StWhy1	LSGAL	KLS	GMVMLQ	FAPA	GVRQYD	WSRKQV	FSLSVTE
AtWhy1	LSGAL	KLS	GMVMLQ	FAPA	GVRQYD	WSRKQV	FSLSVTE
AtWhy2	LSGAL	KLS	GMVMLQ	FAPA	GVRQYD	WSRKQV	FSLSVTE
AtWhy3	LSGAL	KLS	GMVMLQ	FAPA	GVRQYD	WSRKQV	FSLSVTE
Consensus	SG		G	F P	G R YDW	KQ F LS	TE G
	180	190	200	210	220	230	
StWhy1	PNKGRS	LEGTVR	KVLKVE	PLPDG	SGHF	NLSV	NKLNLD
AtWhy1	PFKGKS	LEGTVR	KVLKVE	PLPDG	SGHF	NLSV	NKLNLD
AtWhy2	PSMKSS	AGCVR	KSLSVK	PHADG	SGYF	LSLV	NSTLKT
AtWhy3	PFKGKG	EGTVR	KVLKVE	PLPDG	SGRF	NLSV	NKLNLD
Consensus	P	G VRK	L V P	DGSG F	LSV N		
	240	250	260	270			
StWhy1	NFVLPY	LGWHT	AVNS	PEDA	.SR	.SN	ANP
AtWhy1	NFVLPY	LGWHT	AVNS	PEDA	.SR	.VN	ANP
AtWhy2	SFALPH	MGWNR	TGH	ATEAL	PS	NVS	TKT
AtWhy3	NFVLPY	LGWHT	AVNS	PEDA	.SR	.SN	ANP
Consensus	F P	GW		E			EW

d'affinité par les Whirly que le brin non-codant du ERE du promoteur de *PR-10a* (résultats non-présentés). Le design de cette sonde a été fait par Desveaux et Brisson (2002a) en se basant sur la structure cristallographique de StWhy1. Il a été suggéré que chaque élément PB de la sonde 4xPB serait lié par un protomère du tétramère StWhy1 de telle façon que la sonde 4xPB s'enroulerait autour du tétramère StWhy1 (Desveaux et Brisson, 2002a). Tel qu'indiqué à la figure 2A, les extraits nucléaires bruts ne possèdent qu'une très faible activité de liaison à l'ADN simple brin (Figure 2A, piste 2). Cependant, suite à l'incubation de l'extrait protéique sur résine Q-Sépharose, l'activité de liaison à l'ADN est grandement augmentée (Figure 2A, piste 3). Le même phénomène a été observé chez la pomme de terre, suggérant ainsi que les Whirly répondent à un mécanisme de régulation similaire (Desveaux et al, 2000). Il est donc probable que l'incubation avec une matrice Q-Sépharose soit suffisante pour rompre un complexe protéique et ainsi permettre la liaison à l'ADN des Whirly d'*Arabidopsis*.

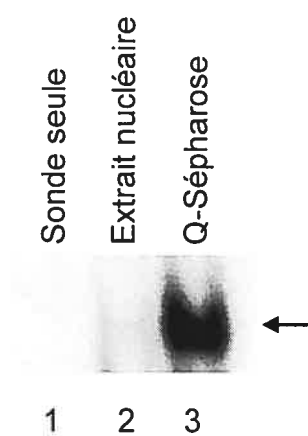
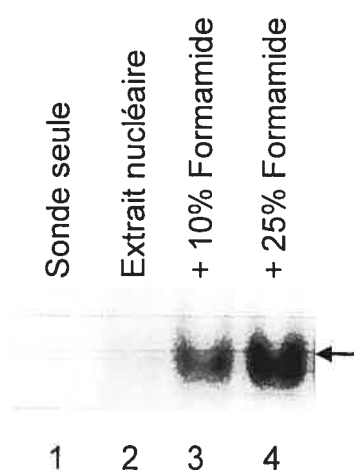
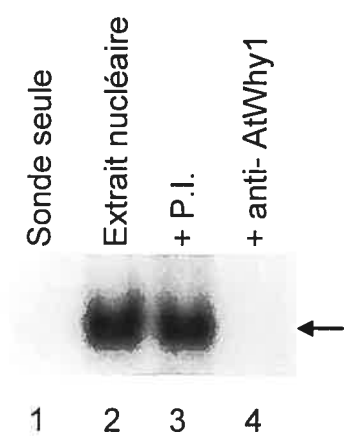
Si cette hypothèse est juste, alors des conditions permettant la dissociation d'interactions protéine-protéine devraient également mener à une augmentation de la liaison à l'ADN des Whirly. Nous avons donc traité des extraits nucléaires de feuilles d'*Arabidopsis* avec différents agents dissociants et avons regardé la liaison à l'ADN des Whirly par retardement sur gel (Figure 2B). L'incubation des extraits nucléaires avec 10 et 25% de formamide a conduit à l'activation de la liaison à l'ADN des Whirly (Figure 2B, piste 2 et 3). Le complexe protéines-ADN a la même mobilité sur gel que le complexe obtenu suite à l'incubation sur Q-Sépharose (résultats non-présentés). Les détergents déoxycholate de sodium et NP40 ont également été testés mais n'ont pas donné d'effets concluants (résultats non-présentés). Ces résultats suggèrent que le traitement avec un agent dissociant tel la formamide mène à la conversion d'un précurseur inactif vers une forme possédant une grande affinité

**Figure 2 : Les extraits nucléaires d'*Arabidopsis* montrent une activité de liaison à l'ADN de type Whirly**

A) Un extrait nucléaire de plants Col-0 a été incubé sur résine Q-Sépharose et l'activation de la liaison à l'ADN des Whirly a été évaluée par retardement sur gel. Piste 1 : Sonde 4xPB seule; piste 2 : 1 µg d'extrait nucléaire brut de feuilles d'*Arabidopsis*; piste 3 : 1 µg d'extrait nucléaire purifié par chromatographie Q-Sépharose. Étant donné la grande homologie entre AtWhy1, AtWhy2 et AtWhy3, il nous est impossible de dire quelle est la protéine responsable de la formation du complexe protéines-ADN observé. Nous indiquons donc le complexe protéines-ADN seulement par une flèche (→).

B) Un extrait nucléaire de plants Col-0 a été incubé avec un agent dissociant et l'activation de la liaison à l'ADN des Whirly a été évaluée par retardement sur gel. Piste 1 : Sonde 4xPB seule; piste 2 : 1 µg d'extrait nucléaire brut; piste 3 : 1 µg d'extrait nucléaire incubé avec 10% de formamide; piste 4 : 1 µg d'extrait nucléaire incubé avec 25% de formamide.

C) Les anticorps anti-AtWhy1 interfèrent avec la liaison à l'ADN des Whirly d'*Arabidopsis* par retardement sur gel. Piste 1 : Sonde 4xPB seule; piste 2 : 1 µg d'extrait nucléaire traité avec 25% formamide ; piste 3 : 1 µg d'extrait nucléaire traité avec 25% formamide et incubé avec le sérum pré-immun avant la réaction de couplage à la sonde radioactive; piste 4 : 1 µg d'extrait nucléaire traité avec 25% formamide et incubé avec l'anticorps anti-AtWhy1 avant la réaction de couplage à la sonde 4xPB.

**A****B****C**

pour l'ADN. Ce précurseur inactif pourrait possiblement être lié par une protéine inhibitrice.

Finalement, si le complexe protéines-ADN observé par retardement sur gel contient un Whirly, l'ajout d'un anticorps anti-AtWhy1 dans la réaction de couplage à la sonde radioactive devrait produire un « supershift » ou interférer avec la liaison à l'ADN du complexe. Tel que démontré à la figure 2C, l'incubation d'un extrait nucléaire avec un anticorps contre AtWhy1 interfère grandement avec la formation d'un complexe protéines-ADN comparativement à l'incubation avec une quantité égale de sérum pré-immun (figure 2C, piste 4 et 3, respectivement). Ceci démontre donc que le complexe protéines-ADN observé contient un Whirly. Cependant, nous ne pouvons affirmer si ce Whirly est AtWhy1, AtWhy2, AtWhy3 ou bien la somme des trois. Les résultats présentés à la figure 8 (section 3.2.2) suggèrent qu'au moins AtWhy1 fait partie de ce complexe.

### 3.1.3 La méthode TAP

Pour identifier les interacteurs protéiques responsables de la régulation de l'activité de liaison à l'ADN des Whirly chez *Arabidopsis*, nous avons utilisé la méthode de purification d'affinité en tandem (Puig et al, 2001). Selon cette technique, une protéine d'intérêt est fusionnée à l'étiquette TAP qui est formée de deux domaines de liaison à un ligand; l'un provient d'un peptide de liaison à la calmoduline et l'autre de la protéine A (Figure 3). Ces deux constituants sont séparés par un site de clivage à la protéase TEV. La protéine étiquetée TAP pourra donc être purifiée sur une résine d'IgG, éluée par clivage à la TEV et repurifiée sur une résine de calmoduline.

La séquence codante pour AtWhy1 a donc été placée en fusion traductionnelle avec l'étiquette TAP (figure 3A). Nous avons choisi AtWhy1

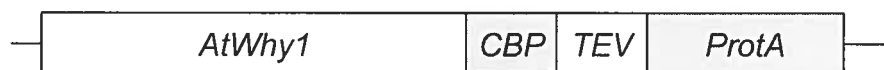
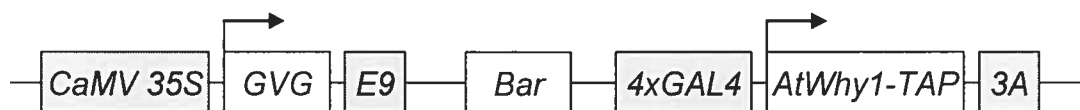
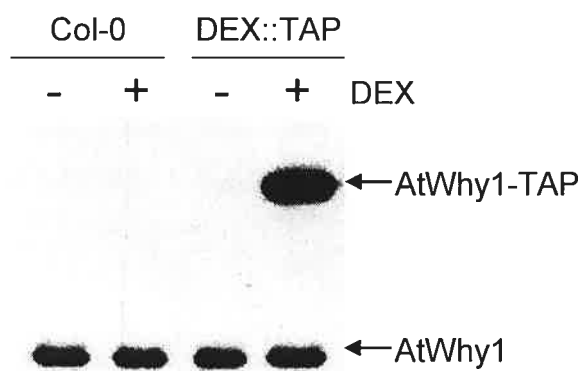
### Figure 3 : Représentation schématique et expression inductible de la construction *AtWhy1-TAP*

A) Schéma de la protéine de fusion *AtWhy1-TAP* utilisée pour la purification d'affinité en tandem. La séquence codante pour *AtWhy1* a été fusionnée en N-terminal de l'étiquette TAP, laquelle est formée du domaine de liaison aux IgG de la protéine A (protA) et du peptide de liaison à la calmoduline (CBP). Ces deux constituants sont séparés par un site de clivage à la protéase TEV qui permettra l'élution de la protéine *AtWhy1* de la colonne d'IgG.

B) Construction *DEX::TAP* utilisée pour l'expression de la protéine de fusion *AtWhy1-TAP* suite au traitement à la dexaméthasone. L'activateur transcriptionnel chimérique GVG a été généré à partir du domaine de liaison à l'ADN de GAL4, du domaine de transactivation de VP16 et du domaine de liaison aux glucocorticoïdes du récepteur aux glucocorticoïdes. Cette fusion est exprimée constitutivement sous le contrôle du promoteur CaMV 35S. Le traitement à la dexaméthasone active le régulateur GVG qui liera l'élément *cis* 4xGAL4 et permettra l'expression de *AtWhy1-TAP*. 3A et E9 sont des terminateurs de la transcription du gène *RbcS* chez le pois. *Bar* est le marqueur de sélection conférant la résistance à l'herbicide BASTA. Ce gène est sous le contrôle d'un promoteur CaMV 35S un d'un terminateur NOS.

C) Immunobuvardage anti-*AtWhy1* réalisé à partir d'un extrait protéique total provenant d'une lignée transgénique *DEX::TAP* ou du contrôle non-transformé Col-0 24 heures suite à l'application de dexaméthasone (+) ou d'eau (-). La protéine *AtWhy1* endogène a été utilisée comme contrôle de chargement égal. 10 µg de protéines ont été chargés dans chaque puits.



**A****B****C**

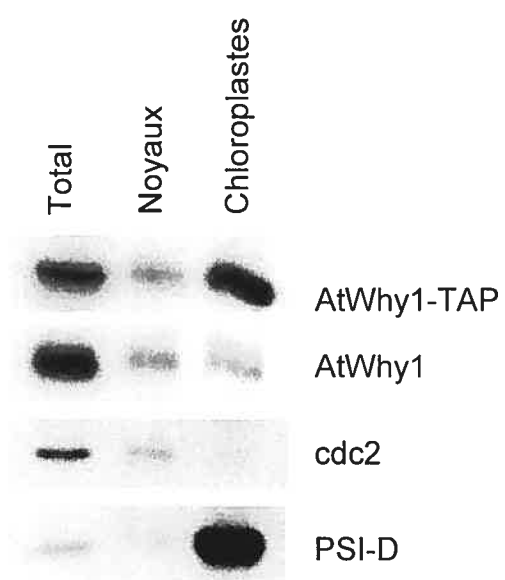
puisque des 3 membres de la famille Whirly chez *Arabidopsis*, c'est lui qui possède le plus d'homologie avec StWhy1. Cette construction a ensuite été insérée dans le vecteur de transformation pDEX (Figure 3B). Ce vecteur permettra l'expression de *AtWhy1-TAP* conditionnellement au traitement des plants avec l'inducteur dexaméthasone. Tel que démontré à la figure 3C, la protéine de fusion *AtWhy1-TAP* s'accumule dans les plants transgéniques *DEX::TAP* seulement après induction à la dexaméthasone. L'expression de *AtWhy1-TAP* semble soutenue et la protéine a été détectée à un niveau comparable aussi longtemps que 72 heures suite au traitement à la dexaméthasone (résultats non-présentés).

### 3.1.4 Localisation subcellulaire de *AtWhy1-TAP*

Il a été démontré que la protéine StWhy1 de la pomme de terre a une localisation nucléaire et chloroplastique (Joyeux et Brisson, résultats non-publiés). Tout comme StWhy1, la séquence N-terminale de *AtWhy1* possède des caractéristiques d'un peptide transit, ce qui suggère que *AtWhy1* pourrait également se retrouver dans les chloroplastes. De plus, le programme de prédiction de localisation subcellulaire TargetP (Emanuelson et al, 2000) classe *AtWhy1* comme protéine plastidique. Pour évaluer à la fois si *AtWhy1* a une double localisation et si la présence de l'étiquette TAP influence sa localisation, un fractionnement cellulaire à partir de feuilles d'*Arabidopsis* a été réalisé. L'intégrité des fractions nucléaires et chloroplastiques a été vérifiée immunologiquement à l'aide d'anticorps dirigés contre des marqueurs de chaque organelle. La figure 4 montre que la protéine nucléaire cdc2 est limitée à la fraction nucléaire et que la protéine chloroplastique PSI-D est limitée à la fraction chloroplastique. La fraction nucléaire est donc dépourvue de contamination provenant des chloroplastes et *vice versa*. Tel que démontré à la figure 4, l'analyse des fractions avec l'anticorps anti-*AtWhy1* a révélé la présence de *AtWhy1* et de *AtWhy1-TAP* dans les deux compartiments étudiés.

**Figure 4 : AtWhy1-TAP localise aux noyaux et aux chloroplastes**

Fractionnement cellulaire des plants *DEX::TAP* induits à la dexaméthasone pendant 24 heures. Cinq  $\mu\text{g}$  d'un extrait protéique total et 1% des organelles purifiés à partir de 5 grammes de feuilles ont été analysés par immunobuvardage à l'aide d'anticorps spécifiques. La détection de la protéine cdc2 a été utilisée comme marqueur nucléaire et la détection de la protéine PSI-D comme marqueur chloroplastique.



Cependant, la protéine AtWhy1-TAP est plus abondante dans les chloroplastes que dans les noyaux comparativement à la protéine AtWhy1 endogène. Il serait donc possible que l'étiquette TAP ait un effet sur l'accumulation de la protéine dans les chloroplastes. L'expression forte et rapide de AtWhy1-TAP suite au traitement des plants à la dexaméthasone pourrait également avoir un effet sur l'abondance relative de la protéine dans les deux compartiments. Nous pouvons tout de même conclure que, tout comme StWhy1, AtWhy1 a une double localisation cellulaire et que l'étiquette TAP sur AtWhy1 ne semble pas interférer sur sa double localisation cellulaire mais seulement sur son abondance relative dans les deux compartiments.

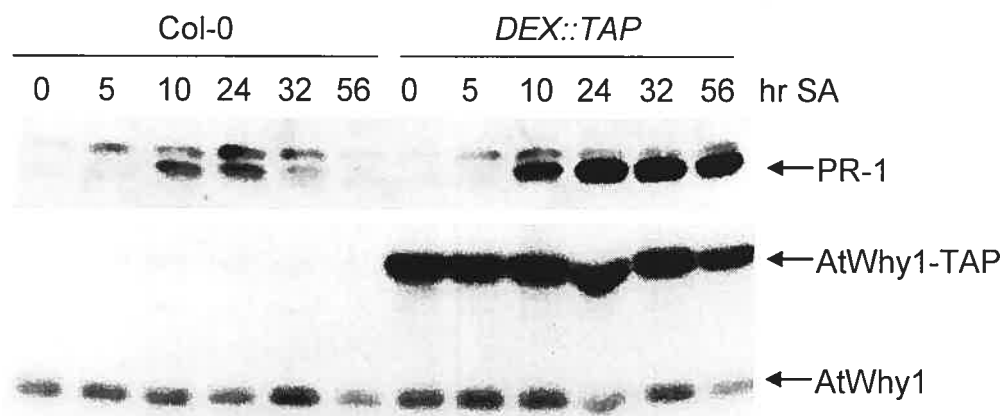
### 3.1.5 Les plants *DEX::TAP* surexpriment *PR-1* suite au traitement au SA

Avant de débiter ce type d'étude, il est important de s'assurer que la protéine de fusion AtWhy1-TAP est active et fonctionnelle. Des études précédentes ont démontré que *AtWhy1* était nécessaire pour l'expression du marqueur de la réponse de défense *PR-1* suite au traitement des plants à l'acide salicylique (Desveaux et al, 2004). En effet, les plants *atwhy1.1* et *atwhy1.2*, qui possèdent chacun une mutation ponctuelle dans le gène *AtWhy1* menant à une diminution de l'activité de la protéine AtWhy1 (voir section 3.2.2), expriment faiblement le gène *PR-1* en réponse à l'acide salicylique. Il semble donc y avoir une corrélation entre l'activité de liaison à l'ADN de AtWhy1 et l'expression de *PR-1*. Nous avons donc émis l'hypothèse que si la protéine AtWhy1-TAP est fonctionnelle alors les plants *DEX::TAP* devraient surexprimer *PR-1* suite au traitement à l'acide salicylique.

Tel que montré à la figure 5, les plants *DEX::TAP*, préalablement induits à la dexaméthasone pour 48 heures, expriment plus fortement et de façon plus soutenue *PR-1* en comparaison aux plants Col-0. Dans les 2 cas, *PR-1* est détectable 10 heures suite au traitement à l'acide salicylique. L'accumulation de

**Figure 5: Les plants transgéniques *DEX::TAP* surexpriment *PR-1* suite au traitement au SA**

Des plants Col-0 et *DEX::TAP* âgés de 3 semaines ont été induits pendant 48 heures à la dexaméthasone et ensuite traités au SA. Des extraits protéiques totaux ont été préparés à 0, 5, 10, 24, 32 et 56 heures suivant le traitement au SA. Dix µg de protéines de chaque échantillon ont par la suite été analysés par immunobuvardage à l'aide d'anticorps spécifiques pour les protéines PR-1 et AtWhy1. La protéine AtWhy1 endogène a été utilisée comme contrôle de chargement égal.



PR-1 dans les plants Col-0 atteint un maximum 24 heures après traitement, diminue à 32 heures pour devenir indétectable à 56 heures. Dans les plants *DEX::TAP*, l'expression de *PR-1* est plus prononcée et la protéine PR-1 est encore fortement détectable 56 heures suite au traitement. L'immunobuvardage réalisé contre AtWhy1 montre que les plants *DEX::TAP* surexpriment la fusion AtWhy1-TAP et que le niveau de AtWhy1 endogène ne varie pas en comparaison avec les plants Col-0. Nous pouvons donc affirmer que la protéine AtWhy1-TAP est active et fonctionnelle. De plus, c'est ici la première fois qu'il est démontré que la surexpression d'un facteur de transcription de la famille des Whirly conduit à une plus forte expression d'un gène relié à la réponse de défense.

### 3.1.6 Purification d'affinité en tandem de AtWhy1

Maintenant que nous savons que la protéine AtWhy1-TAP est fonctionnelle et qu'elle localise aux noyaux et aux chloroplastes, nous pouvons commencer les étapes de purification d'affinité en tandem afin d'identifier le facteur responsable de l'inhibition de la liaison à l'ADN de AtWhy1 dans les tissus non-stressés (voir figure 2). Pour évaluer l'activité de liaison à l'ADN des complexes purifiés par TAP, nous les avons analysés par retardement sur gel. Tel qu'indiqué à la figure 6A, seulement une très faible activité de liaison à l'ADN de AtWhy1 est détectée dans la fraction purifiée par TAP (Figure 6A, piste 2). Cependant, lorsque nous soumettons cette même fraction pure à une incubation avec 25% de formamide, une augmentation significative de la liaison à l'ADN de AtWhy1 est observée (Figure 6A, piste 3). Ceci suggère donc que si cette activation de liaison à l'ADN de AtWhy1 par la formamide est effectivement due à la dissociation d'un inhibiteur, nous avons fort probablement co-purifié cet inhibiteur.



La prochaine étape est de purifier ces complexes en assez grande quantité pour permettre l'identification de leurs constituants par spectrométrie de masse. Nous avons donc purifié AtWhy1-TAP à partir de 150 g de plants *DEX::TAP* induits à la dexaméthasone pour 48 heures. AtWhy1-TAP a également été purifié à partir de plants induits à la dexaméthasone pour 48 heures et traités au SA pour 10 heures. Le traitement au SA active la liaison à l'ADN de AtWhy1, laquelle atteint un sommet observé 10 heures après traitement (Desveaux et al, 2004). Comme témoin négatif, nous avons utilisé la même quantité de plants *DEX::TAP* non-induits à la dexaméthasone et non-traités au SA. Les protéines purifiées ont par la suite été concentrées, séparées par SDS-PAGE et visualisées par coloration au nitrate d'argent. Tel qu'observé à la figure 6B, plusieurs polypeptides ont co-purifié avec la protéine AtWhy1-TAP mais sont absents dans la fraction purifiée à partir des plants témoins (comparer pistes 2 et 3 avec piste 1). Par contre, aucun polypeptide ne semble co-purifier spécifiquement lors du traitement au SA (comparer piste 2 et 3). Ces interacteurs potentiels ont été prélevés du gel et identifiés par spectrométrie de masse LC/MS/MS. Les polypeptides équivalents des pistes 2 et 3 ont été prélevés et combinés pour l'analyse par spectrométrie de masse. Cependant, certains de ces polypeptides migraient trop près les uns des autres, il a donc fallu prélever un fragment de gel contenant deux ou trois polypeptides différents. Les résultats obtenus par spectrométrie de masse sont présentés au tableau II.

Comme on peut le constater, la majorité des polypeptides identifiés correspondent à la protéine AtWhy1. La bande 5, qui est la plus intense sur le gel, est fort probablement attribuable à la protéine de fusion AtWhy1-TAP clivée par la TEV. Le clivage à la TEV lors de l'élution de la colonne d'IgG n'est probablement pas efficace à 100% puisqu'on retrouve AtWhy1 dans le fragment 1 à un poids moléculaire de 47 kDa. En effet, la protéine AtWhy1 et l'étiquette TAP pleine longueur possèdent une masse moléculaire de 27 kDa et

20 kDa, respectivement. La bande 6 est également très intense et pourrait correspondre à AtWhy1 endogène qui aurait été purifié sous forme d'hétérotétramère avec la protéine AtWhy1-TAP. Les autres polypeptides correspondants à AtWhy1 (bandes 2,3,4,7 et 8) pourraient être des formes de dégradation provenant de la protéine AtWhy1-TAP ou AtWhy1 endogène. Nous ne pouvons cependant pas exclure la possibilité de modification post-traductionnelles qui affecteraient la migration sur gel SDS-PAGE.

Le Whirly AtWhy3 a été identifié dans les fragments 7 et 8. Tel que discuté précédemment, AtWhy1 et AtWhy3 ont 78% d'identité de séquence en acides aminés, il est donc probable que ces deux Whirly puissent interagir ensemble pour former un hétérotétramère. Aucune fonction spécifique à AtWhy3 n'a encore été découverte à ce jour.

Une protéine à domaine ENTH a été identifiée dans le fragment 1. Cependant, la protéine identifiée a une masse moléculaire prédite de 95 kDa alors que nous la retrouvons sur notre gel à environ 47 kDa. La forme de 47 kDa résulterait peut-être du clivage de la forme de 95 kDa ou d'un épissage alternatif. Cette interaction devra donc être confirmée par d'autres méthodes. Étant donné que cette région du gel contient beaucoup de contaminants, nous avons pris soin de prélever le fragment de gel correspondant dans le puits témoin ((-) figure 6B). La protéine à domaine ENTH n'a pas été identifiée dans ce fragment. Le domaine ENTH possède généralement 150 acides aminés et est toujours observé en N-terminal d'une protéine. Sa fonction principale est d'interagir avec les bicouches lipidiques et de recruter la clathrine lors du processus d'endocytose. Les protéines à domaine ENTH causent des invaginations prononcées et même la tubulation des membranes. Elles pourraient également être impliquées dans la signalisation et dans l'importation des protéines nucléaires (de Camilli et al, 2002).

Toujours dans le fragment 1 de 47 kDa, la rubisco activase (RCA) a été identifiée. La RCA est une ATPase retrouvée dans le chloroplaste qui catalyse la carbamoylation de la rubisco et module ainsi son activité (Werneke et al, 1988). Elle est présente sous deux isoformes générés par épissage alternatif chez *Arabidopsis*, l'un de 44 kDa et l'autre de 47 kDa (Salvucci et al, 1987 ; Werneke et al, 1989). En se basant sur la figure 6B, nous avons fort probablement purifié l'isoforme long puisque nous observons la RCA a un poids moléculaire de 47 kDa. Tout comme la protéine à domaine ENTH, la RCA n'a pas été détectée dans le fragment prélevé du puits témoin.

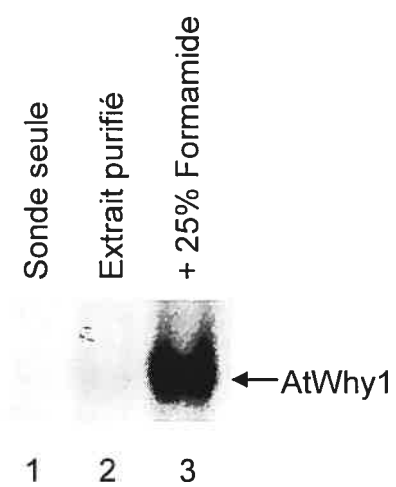
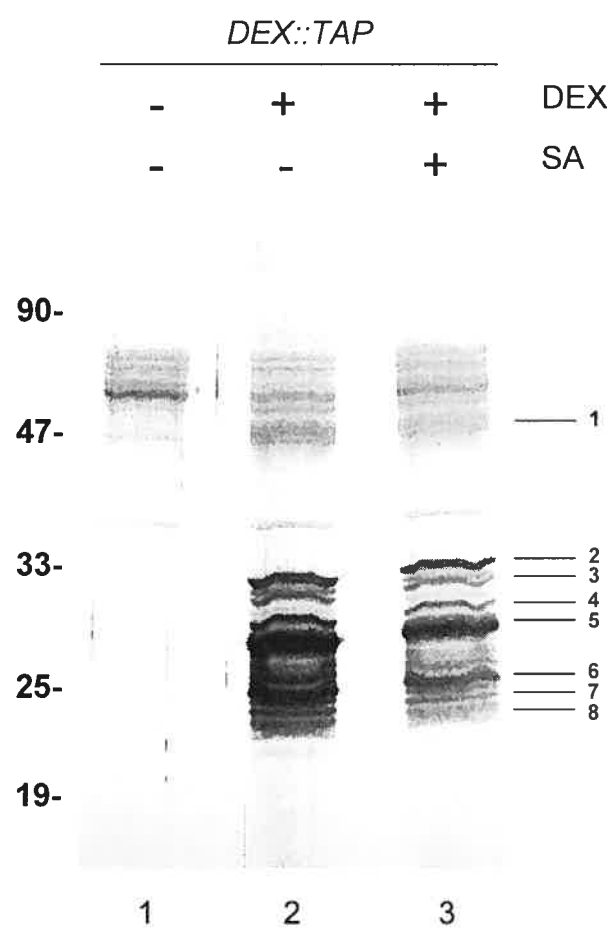
### 3.1.7 Confirmation de l'interaction avec la RCA

Étant donné que la RCA est une enzyme très abondante chez les plantes (2% des protéines solubles de la feuille chez l'épinard ; Robinson et al, 1989), nous avons donc voulu confirmer si son interaction avec AtWhy1-TAP était véritable ou si la RCA, à cause de son abondance, n'était pas tout simplement un contaminant conservé lors de la purification. Pour ce faire, nous avons purifié sur une colonne de IgG (1<sup>ère</sup> colonne de la méthode TAP) les protéines provenant de 20 grammes de plants *DEX::TAP* induits pendant 48 heures au DEX ou 20 grammes de plants non-induits. Les protéines partiellement purifiées ont alors été analysées par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps anti-RCA (Zhang et al, 2002). Tel qu'observé à la figure 7, les deux isoformes de la RCA sont détectés dans la purification réalisée à partir des plants induits et non-induits à un niveau comparable. Ceci signifie que la RCA se fixe à la colonne indépendamment de la présence de AtWhy1-TAP, suggérant ainsi que l'interaction identifiée à la section précédente est artéfactuelle.

### Figure 6: Purification d'affinité en tandem

A) La liaison à l'ADN des complexes purifiés par TAP à partir des plants *DEX::TAP* a été évaluée par retardement sur gel. Piste 1 : Sonde 4xPB seule; piste 2 : Protéines purifiées par TAP; piste 3 : Protéines purifiées par TAP et incubées avec 25% de formamide avant la réaction de couplage à la sonde 4xPB. Deux pour-cent des protéines purifiées à partir de 15 grammes de plants *DEX::TAP* ont été chargées dans chaque puits.

B) Les protéines purifiées par TAP à partir de 150 grammes de plants *DEX::TAP* non-induits (piste 1), induits à la dexaméthasone (piste 2) ou induits à la dexaméthasone et traités 10 heures au SA (piste 3) ont été séparées sur gel SDS-PAGE 12% puis colorées à l'argent. Les fragments du gel prélevés et analysés par spectrométrie de masse LC/MS/MS sont identifiés par des numéros. La bande 1 renferme un triplet et les bandes 3, 7 et 8 un doublet. Les résultats de l'analyse LC/MS/MS sont représentés au tableau II. Les marqueurs de poids moléculaire exprimés en kilodalton sont indiqués à gauche.

**A****B**

**Tableau II : Protéines identifiées par LC/MS/MS qui ont co-purifié avec AtWhy1-TAP lors des analyses de purification d'affinité en tandem**

Fragment <sup>a</sup>	Pureté <sup>b</sup>	Protéines identifiées	Gène	Score <sup>c</sup>
1	Triplet	AtWhy1	at1g14410	142
		Rubisco activase	at2g39730	93
		Protéine à domaine ENTH	at2g43160	43
2	Simple	AtWhy1	at1g14410	46
3	Doublet	AtWhy1	at1g14410	120
4	Singulet	AtWhy1	at1g14410	113
5	Singulet	AtWhy1	at1g14410	72
6	Singulet	AtWhy1	at1g14410	59
7	Doublet	AtWhy1	at1g14410	70
		AtWhy3	at2g02740	39
8	Doublet	AtWhy1	at1g14410	85
		AtWhy3	at2g02740	43

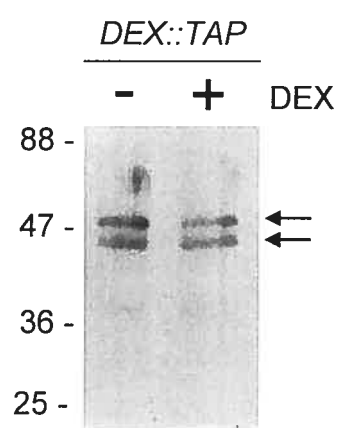
**a** : Correspond au fragment du gel identifié à la figure 6B qui a été prélevé et analysé par spectrométrie de masse.

**b** : Évaluation de la pureté de chaque fragment de gel découpé (i.e. : Nombre de bandes différentes observées dans le fragment prélevé).

**c** : Exprime la probabilité que la protéine identifiée lors de la recherche soit le fruit du hasard. Plus le nombre est élevé, plus la probabilité que la protéine identifiée soit la bonne est grande. Un score >43 indique que la protéine retrouvée dans le fragment de gel analysé possède une identité ou une haute similarité à la protéine identifiée dans les banques de données.

**Figure 7 : La RCA se fixe non-spécifiquement à la colonne de IgG**

Les protéines isolées à partir de 20 grammes de plants *DEX::TAP* induits à la dexaméthasone pendant 48 heures (+) ou traités à l'eau (-) ont été purifiées sur une colonne de IgG. Les protéines ainsi purifiées ont été séparées par SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et analysées par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps anti-RCA. Deux pour-cent des protéines purifiées ont été chargés dans chaque puits. Les deux isoformes de la RCA sont indiqués par une flèche. Les marqueurs de poids moléculaire exprimés en kilodalton sont indiqués à gauche.





## 3.2 Caractérisation des mutants TILLING du gène *AtWhy1* chez *Arabidopsis thaliana*

### 3.2.1 Les mutants TILLING de *AtWhy1*

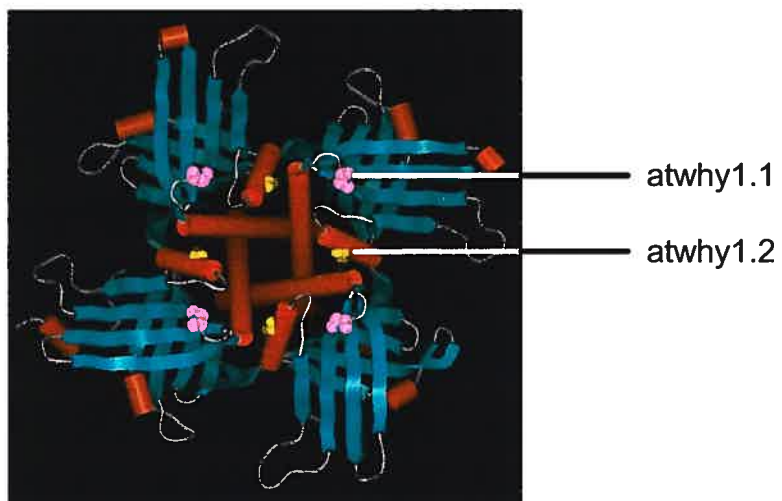
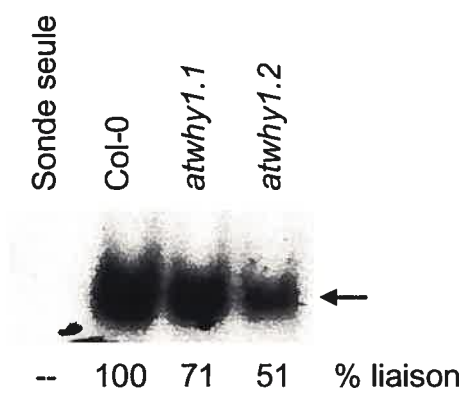
Afin de caractériser le rôle de la famille des Whirly chez *Arabidopsis thaliana*, nous avons obtenu deux lignées du projet TILLING (Colbert et al, 2001) portant des mutations ponctuelles dans la séquence codante de *AtWhy1*. La mutation *atwhy1.1* provoque un changement de la proline 183 pour une sérine et dans la mutation *atwhy1.2* cause un changement de la glycine 148 pour un acide glutamique. Ces mutations touchent des résidus extrêmement conservés à travers les membres de la famille des Whirly chez différentes espèces de plantes (résultats non-présentés et figure 1). Il est donc fort probable que ces mutations aient des effets importants sur l'activité de *AtWhy1*.

La position des résidus correspondants aux mutations TILLING de *AtWhy1* est indiquée sur la structure cristallographique de *StWhy1* à la figure 8A. La mutation *atwhy1.1* touche un brin  $\beta$  contenant le résidu K188 important pour la liaison à l'ADN (Desveaux et Brisson, 2002a). Le mutation d'une proline pour un résidu plus flexible tel une sérine pourrait donc avoir un effet important sur l'activité de liaison à l'ADN de la protéine. D'un autre côté, la mutation *atwhy1.2* tombe dans une hélice  $\alpha$  impliquée dans l'assemblage du tétramère. La mutation d'un petit résidu tel une glycine pour un résidu portant une longue chaîne latérale comme un acide glutamique pourrait donc avoir un effet important pour la stabilité du tétramère.

**Figure 8 : Les extraits nucléaires des mutants *atwhy1.1* et *atwhy1.2* montrent une diminution de l'activité de liaison à l'ADN des Whirly**

A) Structure cristallographique du tétramère de StWhy1. Les résidus mutés dans les mutants *atwhy1.1* et *atwhy1.2* sont indiqués en rose (proline 183) et en jaune (glycine 148), respectivement. La proline 183 et la glycine 148 de la protéine AtWhy1 correspondent à la proline 194 et à la glycine 159 de StWhy1.

B) Des extraits nucléaires provenant des plants Col-0, *atwhy1.1* et *atwhy1.2* ont d'abord été incubés sur résine Q-Sépharose et la liaison à l'ADN des Whirly a été évaluée par retardement sur gel. Piste 1 : Sonde 4xPB seule; piste 2 à 4 : 1 µg d'extrait nucléaire de plants Col-0 (piste 2), *atwhy1.1* (piste 3) et *atwhy1.2* (piste 4). Le complexe protéines-ADN a été découpé du gel et la quantité de sonde radioactive liée a été comptée. Le pourcentage de liaison de chaque mutant est représenté relativement à la liaison observée chez les plants Col-0. Cette expérience a été répétée 5 fois et a donné des résultats similaires.

**A****B**

### 3.2.2 Les mutations *atwhy1.1* et *atwhy1.2* affectent l'activité de liaison à l'ADN des Whirly

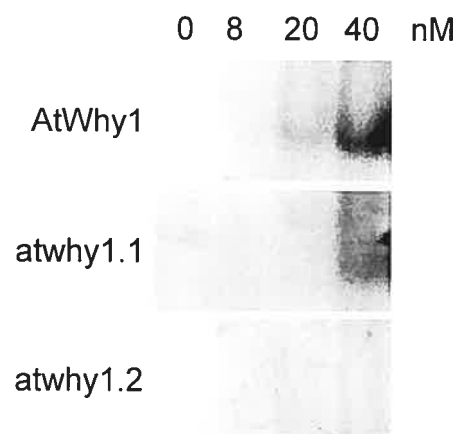
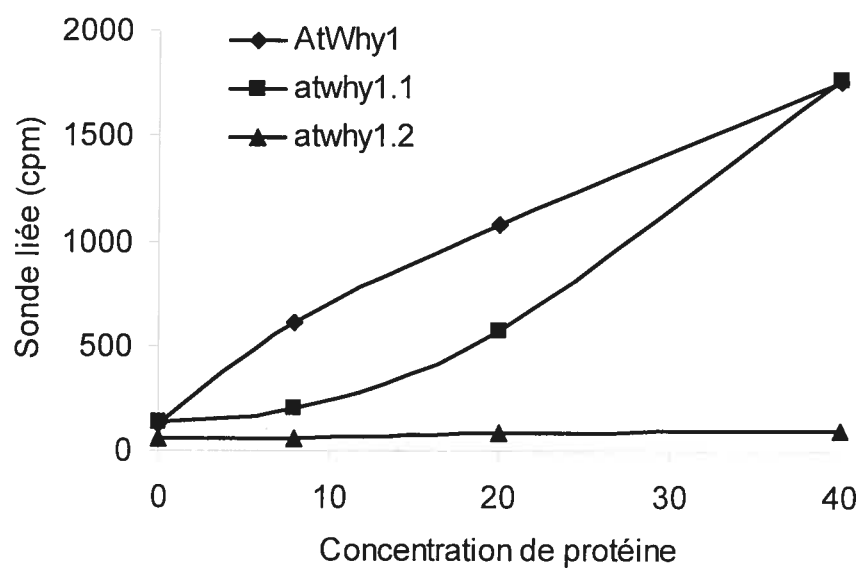
Pour évaluer l'impact des mutations TILLING sur l'activité de liaison à l'ADN de AtWhy1, des extraits nucléaires provenant des plants Col-0, *atwhy1.1* et *atwhy1.2* ont été préparés et analysés par retardement sur gel (Figure 8B). Les extraits nucléaires provenant de tissus non-stressés ne possèdent qu'une très faible activité de liaison à l'ADN de AtWhy1. Cependant, l'incubation de ces extraits sur une matrice Q-Sépharose nous permettra d'activer la liaison à l'ADN de AtWhy1 et de ce fait d'évaluer l'activité des mutants (voir section 3.1.2). Tel qu'indiqué à la figure 8B, les mutants *atwhy1.1* et *atwhy1.2* conservent respectivement 71% et 51% de l'activité de liaison à l'ADN des Whirly en comparaison avec Col-0. Ces résultats suggèrent que les mutations *atwhy1.1* et *atwhy1.2* affectent l'activité de liaison à l'ADN de AtWhy1.

Cependant, il est possible que le complexe protéines-ADN observé par retardement sur gel contienne d'autres Whirly tels AtWhy2 et AtWhy3, lesquels sont très similaires à AtWhy1 (voir figure 1). Pour avoir une idée plus précise de l'activité de liaison à l'ADN de AtWhy1 et des mutants TILLING, ces protéines ont été exprimées dans *E. coli* en fusion à une étiquette His et purifiées par affinité au nickel. Tel que démontré à la figure 9A, les protéines recombinantes *atwhy1.1* et *atwhy1.2* montrent un plus faible activité de liaison à l'ADN comparativement à AtWhy1. Toutefois, les différences observées entre AtWhy1 et *atwhy1.1* subviennent seulement à de faibles concentrations de protéine, représentées graphiquement à la figure 9B. À 40 nM, même si la quantité de sonde radioactive liée est similaire, l'apparence du complexe AtWhy1-ADN sur gel est beaucoup plus claire en comparaison avec le complexe *atwhy1.1*-ADN qui est plus diffus, signe d'instabilité. À des concentrations de protéines supérieures à 40 nM, aucune différence significative n'est observée (résultats non-présentés). D'un autre côté, la protéine *atwhy1.2* montre une très faible

**Figure 9 : Les mutations *atwhy1.1* et *atwhy1.2* affectent la liaison à l'ADN**

A) Les protéines recombinantes AtWhy1, *atwhy1.1* et *atwhy1.2* ont été produites dans *E. coli* et purifiées sur une colonne de nickel. Ensuite, 0, 8, 20 et 40 nM de protéine purifiée ont été incubés avec la sonde 4xPB pour évaluer leur activité de liaison à l'ADN respective par retardement sur gel.

B) Représentation graphique des résultats obtenus en A. Les complexes protéines-ADN observés par retardement sur gel ont été prélevés du gel et la quantité de sonde radioactive liée a été comptée à l'aide d'un compteur à scintillation.

**A****B**

liaison à l'ADN, et ce même à concentration de protéine élevée (résultats non-présentés). Les résultats obtenus avec les protéines recombinantes purifiées confirment ainsi ceux obtenus avec les extraits nucléaires de plantes.

### 3.2.3 Effet de la mutation *atwhy1.2* sur la stabilité du tétramère

Tel que discuté dans la section 3.2.1, la mutation *atwhy1.2* (G148E) pourrait potentiellement nuire à l'assemblage du tétramère. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons étudié le profil d'élution de la protéine *atwhy1.2* recombinante par filtration sur gel. Sur ce type de colonne, les complexes de hauts poids moléculaires auront un volume d'élution plus petit que les complexes de faibles poids moléculaires. Les protéines AtWhy1 et *atwhy1.2* ont donc été injectées sur une colonne Superose 12 et des fractions de 1 mL ont été collectées. Ces fractions ont par la suite été analysées par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps anti-AtWhy1. Tel qu'indiqué à la figure 10, la protéine AtWhy1 est éluée aux fractions 14 et 15 tandis que la protéine *atwhy1.2* est éluée aux fractions 16 et 17, suggérant ainsi que la protéine *atwhy1.2* ne formerait pas de tétramères. Cependant, puisque la colonne de filtration sur gel n'était pas calibrée, il nous est impossible de dire si *atwhy1.2* forme un trimère, dimère ou monomère.

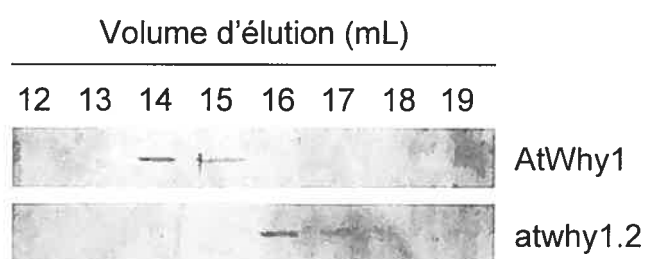
### 3.2.4 L'accumulation de la protéine *atwhy1.2* est affectée dans le mutant *atwhy1.2*

Lorsque la protéine recombinante *atwhy1.2* est induite chez *E. coli* selon des conditions standards, la majorité des protéines produites forment des corps d'inclusions. Pour solubiliser la protéine, nous avons dû faire l'induction à 13°C pendant 72 heures. Ceci refléterait une instabilité de la protéine qui pourrait être expliquée par un mauvais repliement. L'absence de tétramérisation exposerait potentiellement des surfaces hydrophobes de la protéine ce qui résulterait en la

**Figure 10 : La protéine atwhy1.2 ne forme pas de tétramère**

Un mg de protéine provenant d'un extrait cellulaire de *E. coli* exprimant AtWhy1 ou atwhy1.2 ont été injectés sur une colonne de filtration sur gel Superose 12 lavée à un débit de 0.5 mL par minute. Des fractions de 1 mL ont été collectées et la présence de la protéine AtWhy1 ou atwhy1.2 dans chacune de ces fractions a été évaluée par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps anti-AtWhy1.

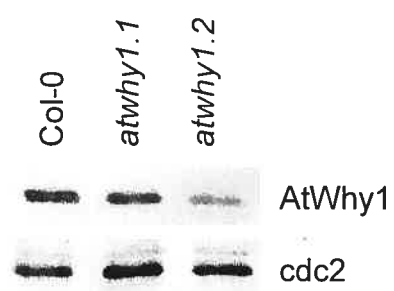




formation de corps d'inclusions chez *E. coli*. Chez la plante, cette instabilité se solderait par la dégradation de la protéine, ce qui affecterait son accumulation. Des extraits protéiques totaux ont donc été préparés à partir des plants Col-0 et des mutants *atwhy1.1* et *atwhy1.2*. La quantité de protéine AtWhy1 et des formes mutées *atwhy1.1* et *atwhy1.2* a ensuite été évaluée par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps anti-AtWhy1. Tel qu'observé à la figure 11, la quantité de la forme mutée de la protéine AtWhy1 détectée dans le mutant *atwhy1.2* est plus faible comparativement aux plants Col-0 et *atwhy1.1*. La mutation *atwhy1.2*, en plus d'avoir un effet sur la liaison à l'ADN et sur la tétramérisation de la protéine, affecte donc également l'accumulation de la protéine.

**Figure 11 : L'accumulation de la protéine *atwhy1.2* est affectée dans le mutants *atwhy1.2***

Des extraits protéiques totaux ont été préparés à partir des plants Col-0 et des mutants *atwhy1.1* et *atwhy1.2*. L'abondance relative de la protéine AtWhy1 et des formes mutées a été évaluée par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps anti-AtWhy1. Dix  $\mu\text{g}$  de protéine ont été chargés dans chaque puits. La détection de la protéine nucléaire *cdc2* a été utilisée comme contrôle de chargement égal.



## 4.0 Discussion

### 4.1 Mécanisme de régulation des Whirly

Cette étude a démontré que AtWhy1 était entreposé sous forme inactive dans les extraits nucléaires de feuilles d'*Arabidopsis* et que son activité de liaison à l'ADN pouvait être induite par incubation sur une résine Q-Sépharose (figure 2A). Le même phénomène a été observé chez le Whirly StWhy1 de la pomme de terre, ce qui suggère un mécanisme d'activation conservé chez les facteurs de transcription Whirly (Desveaux et al, 2000). De plus, nous avons découvert que l'incubation d'extraits nucléaires de feuilles d'*Arabidopsis* avec de la formamide, un agent dissociant, conduisait à la stimulation de l'activité de liaison à l'ADN de AtWhy1 (figure 2B).

Chez le tabac, le facteur SARP (« *salicylic acid response protein* »), un complexe contenant le facteur de transcription TGA2.2, est également entreposé sous forme inactive et son activité de liaison à l'ADN peut être induite par le traitement des feuilles au SA (Jupin et Chua, 1996 ; Niggeweg et al, 2000). La liaison à l'ADN de SARP peut aussi être activée *in vitro* par le traitement d'extraits nucléaires de feuilles avec la formamide, de façon similaire à ce que nous avons observé avec AtWhy1. Les auteurs suggèrent que SARP serait associé avec un inhibiteur, lequel serait dissocié lors du traitement des feuilles au SA ou lors du traitement d'extraits nucléaires à la formamide (Jupin et Chua, 1996). Chez les mammifères, l'interaction entre le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et son inhibiteur I $\kappa$ B peut aussi être dissociée par le traitement d'extraits cellulaires à la formamide, ce qui permet à NF- $\kappa$ B de lier l'ADN (Baeuerle et Baltimore, 1988). Ces résultats nous portent à croire que AtWhy1 serait également associé à un inhibiteur. Cette interaction serait rompue *in vitro* lors de l'incubation sur Q-Sépharose ou avec la formamide. *In vivo*, une voie de signalisation impliquant un homologue de la PKC de

mammifères conduirait à la dissociation de cette interaction (Després et al, 1995, Subramaniam et al, 1997). Dans l'espoir d'identifier cet inhibiteur, des études TAP ont été entreprises.

À la lumière des résultats obtenus par TAP, nous pouvons nous demander si l'un des interacteurs potentiels repêchés pourrait être l'inhibiteur de AtWhy1. En effet, nous observons par retardement sur gel que la quasi-totalité des complexes purifiés par TAP sont incapables de lier l'ADN avant traitement à la formamide (figure 6A), ce qui suggère que ces complexes seraient tous en interaction avec l'inhibiteur recherché. Par contre, en se basant sur le patron de migration des protéines purifiées par TAP (figure 6B), on remarque que les interacteurs potentiels sont en quantité grandement sous stœchiométrique comparativement à la quantité de AtWhy1 purifiée. Il est donc improbable que le peu d'interacteurs repêchés soit suffisant pour interagir avec cet excès de AtWhy1 et d'inhiber sa liaison à l'ADN. De plus, selon notre hypothèse, l'activation de la liaison à l'ADN de AtWhy1 suivant le traitement au SA se ferait par la dissociation d'un inhibiteur. Cependant, aucun polypeptide co-purifié avec AtWhy1-TAP ne semble disparaître après traitement au SA (figure 6, comparer piste 2 et 3). L'inhibition de l'activité de AtWhy1 ne se ferait donc vraisemblablement pas via l'interaction avec les protéines repêchées. De plus, des résultats préliminaires obtenus par filtration sur gel indiquent que AtWhy1 ferait partie d'un complexe de taille similaire avant et après incubation d'un extrait nucléaire sur une résine Q-Sépharose (résultats non-présentés). Ces résultats sont donc en désaccord avec notre hypothèse qui était que l'incubation sur Q-Sépharose permettait la dissociation de l'interaction entre un inhibiteur protéique et AtWhy1, ce qui aurait mené à une diminution de la taille du complexe contenant AtWhy1.

Quel serait donc le mécanisme de régulation de l'activité de liaison à l'ADN des Whirly dans ce cas ? Une possibilité serait que l'inhibiteur recherché

ne soit pas une protéine mais plutôt une petite molécule. Celle-ci n'aurait pu être détectée par la méthode TAP et son effet sur la taille du complexe contenant AtWhy1 serait négligeable et n'aurait pu être observé par filtration sur gel.

L'analyse de la structure cristallographique du tétramère de StWhy1 nous permet de formuler d'autres hypothèses concernant la régulation de l'activité de liaison à l'ADN des Whirly. Il a été observé que le résidu W272 de l'extrémité C-terminale d'un protomère interagit avec le résidu K188 du protomère adjacent. Cette lysine est critique pour la liaison à l'ADN puisque sa mutation pour une alanine abolit totalement l'activité de liaison à l'ADN de la protéine StWhy1 recombinante. L'interaction de W272 avec K188 pourrait donc bloquer le contact entre cette lysine et l'ADN. En effet, il a été démontré que la mutation de W272 pour une alanine augmentait la liaison à l'ADN de la protéine recombinante par un facteur 3.5 (Desveaux et Brisson, 2002a). Ces résultats suggèrent que l'extrémité C-terminale de StWhy1 agit comme une région d'autorégulation négative qui interférerait avec la liaison à l'ADN du tétramère en agissant telle une barrière physique. Les résidus W272 et K188 sont conservés chez les trois Whirly d'*Arabidopsis* (figure 1) de même que chez tous les Whirly identifiés à ce jour (Maréchal et Brisson, non-publiés), suggérant ainsi que ce mode d'autorégulation est très conservé à travers la famille Whirly.

Plusieurs questions concernant le mécanisme de régulation des Whirly demeurent sans réponse. En effet, même si le résidu W272 de StWhy1 est impliqué dans une autorégulation négative, la protéine StWhy1 recombinante possède quand même une importante activité de liaison à l'ADN. De plus, cette activité n'est pas stimulée par l'incubation de la protéine recombinante sur Q-Sépharose ou par le traitement à la formamide contrairement à ce qui est observé avec les extraits nucléaires de pomme de terre et d'*Arabidopsis* (résultats non-présentés et figure 2). Ceci signifierait donc qu'il y a tout de

même un mécanisme d'inhibition spécifique qui se produit chez la plante et qui n'est pas présent chez la protéine recombinante. Il est également probable que AtWhy1 adopte une conformation différente dans la plante que dans *E. coli* ce qui lui conférerait cette inhibition.

## 4.2 Interaction entre AtWhy1 et AtWhy3

Les études de AtWhy1 par purification d'affinité en tandem ont mené à la découverte du Whirly AtWhy3 comme interacteur potentiel. Cette interaction ne serait pas surprenante étant donné la grande homologie entre ces deux protéines (78% d'identité et 87% de similarité). Il est donc fort possible que AtWhy1 et AtWhy3 puissent former des hétérotétramères. La capacité du Whirly StWhy1 de la pomme de terre à interagir avec d'autres membres de sa famille a également été observée lors d'études de double-hybrides chez la levure (Joyeux et Brisson, résultats non-publiés). Cette hétérotétramérisation pourrait permettre la reconnaissance d'un élément d'ADN différent de la boîte PB (GTCAAAA(A/T)) ou le recrutement de différents coactivateurs de la transcription.

Nous pouvons tout de même nous questionner sur la véracité de l'interaction entre ces deux Whirly. Il serait possible que la surexpression de AtWhy1-TAP soit suffisante pour forcer l'interaction avec AtWhy3. Cette interaction ne serait donc pas physiologiquement pertinente mais plutôt un artefact de surexpression. Les résultats de spectrométrie de masse sont également discutables. La protéine AtWhy3 a été identifiée avec un score relativement faible de 39 (fragment 7) et 43 (fragment 8 ; tableau I). Il est à noter qu'un score supérieur à 43 indique soit une identité soit une haute similarité avec la protéine identifiée lors des recherches sur les banques de données. Puisque AtWhy1 et AtWhy3 partagent des régions hautement similaires, il est probable que des peptides provenant de AtWhy1 aient été



faussement attribués à AtWhy3. En effet, le seul peptide identifié correspondant à AtWhy3 lors des analyses MS/MS est AALTIEPR. Un peptide très similaire est retrouvé dans la protéine AtWhy1 (AALTVDPR). Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité que la protéine identifiée comme étant AtWhy3 ne soit en fait que AtWhy1.

### 4.3 Régulation de l'expression de *PR-1* par AtWhy1

Nous avons démontré par l'entremise des plants *DEX::TAP* que la surexpression de la protéine de fusion AtWhy1-TAP mène à la surexpression du marqueur de la réponse de défense *PR-1* suite au traitement au SA. C'est la première fois qu'il est démontré que la surexpression d'un Whirly mène à une plus forte expression d'un gène relié à la réponse de défense. Des études effectuées par le laboratoire ont également démontré que l'expression de *PR-1* en réponse au SA est affectée négativement dans les mutants *atwhy1.1* et *atwhy1.2* (Desveaux et al, 2004). Il est donc indéniable que AtWhy1 joue un rôle important dans la régulation de *PR-1* lors de la réponse de défense. Cependant, même si le promoteur de *PR-1* contient un élément PB, la délétion de celui-ci n'a pas d'effet significatif sur l'expression de *PR-1* (Lebel et al, 1998). Il est donc possible que la régulation de l'expression de *PR-1* par AtWhy1 soit indirecte. Il serait quand même intéressant d'évaluer par immunoprécipitation de la chromatine si AtWhy1 s'associe au promoteur de *PR-1* lors de la réponse de défense.

L'élément PB (GTCAAAA(AT)), lequel est reconnu et lié par les Whirly, est enrichi dans les promoteurs de gènes co-régulés dans des conditions qui induisent le SAR tel le traitement des plantes au SA (Maleck et al, 2000 ; Desveaux et al, 2004). Sur les 26 gènes co-régulés de cette façon, 11 contiennent au moins un élément PB. Une de ces 11 cibles potentielles des Whirly est un gène codant pour une pyruvate décarboxylase (PDC ;

at4g33070), une enzyme qui pourrait être impliquée dans la réponse de défense. Il a été démontré que la surexpression d'une PDC d'origine bactérienne chez la pomme de terre conduit à l'expression constitutive de gènes *PR*, à une résistance accrue à l'agent pathogène *Phytophthora infestans* et à la formation de lésions semblables à celles observées lors de la réponse hypersensible (Tadege et al, 1998). Il faudrait donc étudier si l'expression de la PDC (at4g33070) chez *Arabidopsis* est contrôlée par AtWhy1 et si la surexpression de cette PDC dans des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* conduit à la surexpression de *PR-1*. La régulation de l'expression de *PR-1* par AtWhy1 pourrait donc se faire indirectement via l'expression de cette PDC. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions d'abord regarder si l'expression de la PDC d'*Arabidopsis* est plus faible dans les plants mutants *atwhy1.2* que dans les plants Col-0 suite au traitement au SA. Nous pourrions ensuite tester par expression transitoire si l'élément PB du promoteur de la PDC est actif. Pour ce faire, une stratégie semblable à celle utilisée par Desveaux et al (2004) lors de l'étude de l'élément PB du gène *PR-10a* de la pomme de terre sera employée. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine à l'aide d'anticorps spécifiques nous permettraient de savoir si AtWhy1 est associé au promoteur de la PDC lors de la réponse de défense. Finalement, la génération de plants antisens pour le gène de la PDC nous permettrait de savoir si cette enzyme affecte la régulation de l'expression de *PR-1* lors de la réponse de défense.

#### 4.4 À la recherche d'interacteurs SA-dépendants

Les résultats obtenus par la purification d'affinité en tandem de AtWhy1 ne nous ont pas permis d'identifier des protéines qui interagissent spécifiquement avec AtWhy1 lors du traitement à l'acide salicylique (figure 6). Pourtant, AtWhy1 semble jouer un rôle important dans la régulation de l'expression de *PR-1* et lors de la réponse de défense en général (figure 5 et Desveaux et al, 2004). Les interacteurs qui gouvernent l'activité de AtWhy1 lors

de la réponse de défense, par exemple des kinases qui seraient impliquées dans le processus d'activation de sa liaison à l'ADN ou différents coactivateurs de la transcription responsables de la transactivation des gènes par les facteurs de transcription, interagissent peut-être trop faiblement ou de façon transitoire et de ce fait n'auraient pas été purifiés par TAP. Pour remédier à ce problème, la méthode TAP modifiée décrite par Rohila et al (2004) pourrait être utilisée. Ces auteurs ajoutent une étape de traitement des plantes à la formaldéhyde avant d'effectuer l'extraction des protéines, ce qui a pour effet de ponter de façon covalente les interactions protéine-protéine et donc de les stabiliser. Le pontage à la formaldéhyde pourrait également ponter les interactions protéine-ADN, ce qui nous permettrait de purifier AtWhy1-TAP en association avec la chromatine et ainsi d'identifier des interacteurs qui s'associent à AtWhy1 de manière ADN-dépendante.

#### **4.5 Double localisation de AtWhy1**

Par des expériences de fractionnement cellulaire, nous avons démontré que la protéine AtWhy1 a une localisation nucléaire et chloroplastique (figure 4). La présence d'une séquence transit en N-terminal de AtWhy1 supporte donc les résultats obtenus. L'ADNc de AtWhy1 encode une protéine prédite de 29 kDa mais nous la retrouvons à une masse moléculaire de 24 kDa dans les deux compartiments étudiés, ce qui signifie que la forme nucléaire et la forme chloroplastique de AtWhy1 ont toutes deux perdu la séquence transit. Le mécanisme par lequel la séquence transit de la forme nucléaire de AtWhy1 est clivée n'est pas résolu. Il serait possible que la séquence transit soit clivée par une protéase cytoplasmique tel que suggéré pour la phosphorylase de l'amidon de la pomme de terre et la leucine aminopeptidase de la tomate (Brisson et al, 1989 ; Gu et al, 1996). La protéine de fusion AtWhy1-TAP a également une double localisation (figure 4), ce qui confirme que c'est bien AtWhy1 qui est présent aux deux compartiments et non un membre de la famille Whirly qui

localise aux chloroplastes et un autre membre qui localise au noyau. Cette double localisation a aussi été observée chez le Whirly StWhy1 de la pomme de terre (Joyeux et Brisson, résultats non-publiés). Plusieurs Whirly identifiés dans différentes espèces de plantes possèdent une région N-terminale qui partage les caractéristiques d'une séquence transit, suggérant que ce phénomène est conservé à travers la famille Whirly (Maréchal et Brisson, résultats non-publiés).

Très peu de protéines ayant une double localisation chloroplaste / noyau ont été répertoriées. Le répresseur SEBF de la pomme de terre possède cette caractéristique (Boyle et Brisson, 2001). Curieusement, SEBF et StWhy1 régulent toutes deux le gène *PR-10a* de la pomme de terre. Déterminer la fonction de *PR-10a* pourrait sans doute nous donner des indications sur le rôle que pourrait jouer la double localisation de StWhy1 et SEBF. Récemment, un homologue du facteur de transcription TFIIB chez *Arabidopsis*, la protéine pBrp, a été localisé aux chloroplastes et au noyau. pBrp est en fait seulement associée à la face cytoplasmique de la membrane externe du chloroplaste et attendrait un signal pour se diriger vers le noyau (Lagrange et al, 2003). Les résultats obtenus avec AtWhy1 ne nous permettent pas de discriminer si AtWhy1 est à l'intérieur du chloroplaste ou seulement en association avec la membrane externe. Cependant, les résultats obtenus avec StWhy1-GFP montrent clairement que la protéine se trouve à l'intérieur du chloroplaste (Joyeux et Brisson, résultats non-publiés). Nous pouvons donc nous attendre à ce que AtWhy1 se comporte de la même façon.

#### **4.6 Implication du domaine ENTH dans la double localisation de AtWhy1**

Les études TAP ont également conduit à l'identification d'une protéine à domaine ENTH (At2g43160) comme interacteur potentiel de AtWhy1.

Cependant, cette protéine a une masse moléculaire prédite de 95 kDa alors que nous la retrouvons sur notre gel à environ 47 kDa (figure 6). Nous avons cherché le génome d'*Arabidopsis* dans l'espoir d'identifier un homologue de 47 kDa possédant un domaine ENTH mais nous n'en avons trouvé aucun. Il serait possible que la forme de 47 kDa soit le fruit d'un événement d'épissage alternatif de l'ARN *At2g43160*. Il serait intéressant de déterminer si nous pouvons amplifier un ARNm codant pour une protéine de 47 kDa avec un domaine ENTH en N-terminal.

Les domaines ENTH ont pour la première fois été identifiés chez les Epsin, des interacteurs de Eps15, une protéine impliquée dans l'internalisation / signalisation du récepteur à l'EGF. Les Epsin ont tous le domaine ENTH, un domaine d'environ 150 acides aminés toujours retrouvé en N-terminal des protéines et conservé lors de l'évolution. Le domaine ENTH lie les phosphatidylinositol(4,5) bisphosphates (PIP<sub>2</sub>) membranaires et de ce fait induit une courbure de la membrane plasmique qui peut résulter en la formation de fins tubules. En plus du domaine ENTH, les Epsin contiennent d'autres motifs pour interagir avec d'autres protéines tels les répétitions DX(W/F) pour l'interaction avec l'adaptateur de la clathrine AP-2, des « boîtes clathrines » pour l'interaction avec la chaîne lourde de la clathrine et des répétitions NPF pour l'interaction avec Eps15. Les Epsin servent donc de lien entre la membrane plasmique et la clathrine lors de l'endocytose. Ce ne sont pas toutes les protéines à domaines ENTH qui sont des Epsin. Cependant, le domaine ENTH et les motifs décrits précédemment sont souvent retrouvés dans les mêmes protéines (résumé dans De Camilli et al, 2002). La protéine à domaine ENTH *At2g43160* identifiée comme interacteur de *AtWhy1* contient 5 motifs DX(W/F) pour l'interaction avec AP-2 mais aucun autre motif consensus retrouvé chez les Epsin. Ainsi, l'utilisation d'anticorps spécifiques à la protéine Epsin1 de mammifère (Chen et al, 1998), laquelle possède un domaine ENTH,

pourrait nous permettre de détecter une protéine de 47 kDa immunologiquement reliée à Epsin1 chez *Arabidopsis thaliana*.

Les protéines à domaine ENTH sont généralement impliquées dans le processus d'endocytose et sont présentes chez tous les organismes eucaryotes (résumé dans De Camilli et al, 2002). Même si une protéine à domaine ENTH n'a pas été repêchée lors d'études double-hybrides chez la levure avec le Whirly StWhy1, les protéines  $\alpha$ -adaptin et la sous-unité epsilon du coatomer, deux protéines impliquées dans le trafic membranaire, ont été identifiées comme interacteurs potentiels (Lévesque et Brisson, résultats non-publiés). À ce jour, les fonctions remplies par le domaine ENTH n'ont pas encore été caractérisées chez les plantes.

Le domaine ENTH possède des homologies structurelles avec d'autres domaines connus comme les répétitions *aramadillo* de la  $\beta$ -catenin et les répétitions HEAT de la kariopheryn- $\beta$  (importin- $\beta$ ). Les répétitions *aramadillo* et HEAT sont impliquées dans les interactions protéine-protéine. La  $\beta$ -catenin et la kariopheryn- $\beta$ , même si elles n'ont pas de signal de localisation nucléaire, font la navette entre le cytoplasme et le noyau. Le même phénomène a été observé chez Epsin1. L'incubation de cellules avec la leptomycine, un inhibiteur de l'exportation nucléaire Crm1-dépendant, conduit à l'accumulation rapide de Epsin1 au noyau, ce qui signifie que Epsin1 fait la navette nucléocytoplasmique. Il a été démontré que Epsin1 interagit avec le facteur de transcription à doigts de zinc PLZF. La fonction de cette interaction n'est pas connue. En plus du rôle dans l'endocytose, on voit donc que les protéines à domaines ENTH pourraient également jouer un rôle dans l'importation de protéines au noyau et dans la régulation d'événements transcriptionnels (Hyman et al, 2000).

Quelle serait donc la fonction de l'interaction entre AtWhy1 et At2g43160? L'étude du chloroplaste par microscopie confocale a mené à la découverte d'extensions tubulaires de la membrane des plastes (chloroplastes non-différenciés) appelées stromules (pour « *stroma-filled tubule* » ; résumé dans Kwok et Hanson, 2004a). Ces structures connectent les plastes entre eux et permettent l'échange de macromolécules telles les protéines. Il a été observé dans certaines cellules que les noyaux et les plastes étaient situés très près les uns des autres et que des stromules semblaient fusionner avec l'enveloppe nucléaire (Kwok et Hanson, 2004b). Puisque nous savons que le domaine ENTH seul est capable de former des tubules membranaires lorsque surexprimé dans les cellules COS (Ford et al, 2002), il est possible que ces stromules soient le fruit de l'activité des protéines à domaine ENTH chez les plantes. La protéine At2g43160 pourrait alors guider AtWhy1 le long du stromule jusqu'au noyau. Lorsque le complexe serait à proximité du noyau, At2g43160 permettrait l'importation de AtWhy1 au noyau via son activité de navette nucléocytoplasmique.

Le laboratoire est en possession de cellules de tabac en culture exprimant la protéine de fusion StWhy1-GFP. Dans ces cellules, StWhy1-GFP est observée dans les chloroplastes, les noyaux et les stromules (Joyeux et Brisson, résultats non-publiés). Ces cellules pourraient être transformées avec une construction permettant l'expression d'un ARN antisens de l'homologue chez le tabac du gène *At2g43160*. Nous pourrions alors évaluer l'effet de l'abolition de l'expression de ce gène sur la formation de stromules et sur la double localisation cellulaire de StWhy1-GFP. Si un effet est observé, nous pourrions générer des plants d'*Arabidopsis* transgéniques antisens pour *At2g43160* et ainsi déterminer l'impact que peut avoir le changement de la localisation cellulaire de AtWhy1 sur la réponse de défense et la résistance aux maladies.

## 4.7 Les mutants *atwhy1* : des outils pour l'étude de la fonction de AtWhy1

Dans la seconde partie de ce mémoire, nous avons présenté la caractérisation moléculaire des mutants *atwhy1* chez *Arabidopsis thaliana*. Les extraits nucléaires des mutants *atwhy1.1* et *atwhy1.2* conservent 71% et 51% de l'activité de liaison à la sonde 4xPB comparativement aux extraits de plants de type sauvage, respectivement (figure 8). La réduction de l'activité de liaison à l'ADN de AtWhy1 observée avec les extraits nucléaires corrèle avec l'activité de liaison à l'ADN des protéines *atwhy1.1* et *atwhy1.2* recombinantes purifiées produites dans *E. coli* (figure 9), ce qui nous permet de conclure que l'effet observé sur la liaison à la sonde 4xPB dans les extraits nucléaires des plants mutants est bien causé par AtWhy1. Nous pouvons également tracer une corrélation entre la résistance des plants d'*Arabidopsis* à l'infection et l'activité de liaison à l'ADN de AtWhy1. Les mutants *atwhy1.2* sont plus susceptibles à l'infection par l'oomycète *Peronospora parasitica* (isolat Noco2) que les mutants *atwhy1.1*, lesquels sont plus susceptibles que les plants de type sauvage (Desveaux et al, 2004). L'activité de liaison à l'ADN de AtWhy1 semble donc très importante lors de la réponse de défense.

La mutation *atwhy1.1* (P183S) touche le brin  $\beta 6$  contenant le résidu K177 (K188 chez StWhy1) critique pour la liaison à l'ADN (Desveaux et Brisson, 2002a). La mutation d'un résidu proline pour une sérine plus flexible pourrait donc avoir un effet sur le positionnement de cette lysine lors de la liaison à l'ADN, diminuant ainsi l'affinité de la protéine mutante pour l'ADN. Il serait intéressant d'évaluer si d'autres mutations dans ce même brin  $\beta 6$  peuvent également affecter l'affinité de liaison à l'ADN. Ceci nous indiquerait si l'intégrité du brin  $\beta 6$  en entier est importante dans le processus de liaison à l'ADN.



L'effet de la mutation *atwhy1.2* (G148E) sur l'affinité de liaison à l'ADN observée chez la protéine recombinante purifiée est probablement la conséquence de l'absence de tétramérisation de la protéine mutante (figure 10). La glycine 148 (glycine 159 chez StWhy1) est située dans l'hélice  $\alpha 1$  laquelle fait des contacts avec l'hélice  $\alpha 2$  du protomère adjacent. Sur la structure de StWhy1, la glycine 159 est enfouie à l'intérieur de la protéine dans un environnement hydrophobe et est à proximité des résidus Ala225, Ala228 et Val229 de l'hélice  $\alpha 2$  du protomère adjacent. Ces résidus sont conservés chez AtWhy1. La mutation d'une glycine pour un résidu acide glutamique qui a une longue chaîne latérale causerait sans doute des contraintes stériques à l'interaction entre  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ . De plus, le positionnement d'un résidu chargé négativement dans un environnement hydrophobe n'est pas favorable. Ceci expliquerait donc pourquoi la protéine *atwhy1.2* ne forme pas de tétramères.

La diminution de l'activité de liaison à la sonde 4xPB des extraits nucléaires provenant du mutant *atwhy1.2* n'est probablement pas seulement la conséquence de la diminution d'affinité de la protéine *atwhy1.2* observée chez la protéine recombinante (figure 9). En effet, nous avons remarqué que la protéine mutante *atwhy1.2* est moins abondante dans les plants *atwhy1.2* que la protéine AtWhy1 dans les plants de type sauvage (figure 11). Il serait possible que l'absence de tétramérisation soit perçue comme un mauvais repliement et que la protéine soit de ce fait dégradée. En effet, les protéines endommagées ou mal repliées à cause de mutations ou d'erreurs lors de traduction sont généralement dégradées dans un mécanisme impliquant le système protéasome-ubiquitine (Stirling et al, 2003). Cependant, nous ne pouvons pas éliminer la possibilité que la mutation *atwhy1.2* affecte un procédé en amont du repliement de la protéine telles la transcription du gène ou la stabilité de l'ARNm. Pour le tester, l'accumulation de l'ARNm *atwhy1.2* devrait être vérifiée par buvardage de Northern ou par PCR en temps réel. Nous pouvons tout de même affirmer que la diminution de l'activité de liaison à l'ADN

observée dans les extraits nucléaires de *atwhy1.2* est probablement un effet combiné de la diminution de l'affinité de liaison à l'ADN de la protéine *atwhy1.2* et de sa faible abondance dans la cellule.

## 5.0 Conclusion et perspectives

Les résultats présentés dans ce mémoire nous ont permis d'élargir nos connaissances sur le mécanisme de régulation de l'activité de liaison à l'ADN de AtWhy1 chez *Arabidopsis thaliana*. Cependant, ce mécanisme n'a pas été élucidé et plusieurs questions demeurent sans réponse. Quel serait l'impact *in vivo* de la mutation du Trp272 sur l'activité de AtWhy1 ? Cette mutation serait-elle suffisante pour lever complètement l'inhibition observée dans les tissus non-stressés ? Est-ce que AtWhy1 est phosphorylé durant la réponse de défense ? Sur quel(s) résidu(s) ? Déterminer le(s) site(s) de phosphorylation de AtWhy1 et analyser l'impact sur sa structure cristallographique nous permettrait sans doute d'effectuer un pas dans la bonne direction.

Les études par purification d'affinité en tandem ont mené à la découverte d'une protéine à domaine ENTH (At2g43160) comme interacteur potentiel de AtWhy1. Est-ce que cette interaction est impliquée dans le mécanisme de double localisation de AtWhy1 ? L'utilisation de plants *knockout* ou antisens pour le gène *At2g43160* nous permettra d'étudier l'impact de ce gène sur la localisation subcellulaire de AtWhy1. Cependant, avant de poursuivre ce projet, cette interaction devra être confirmée.

Nos résultats montrent que AtWhy1 est impliqué dans la régulation du marqueur du SAR *PR-1*. Cette régulation est-elle directe ou indirecte ? Quels sont les partenaires d'interaction de AtWhy1 lors de la réponse de défense ? L'utilisation des plants *DEX::TAP* générées durant cette étude conjointement à la méthode TAP modifiée décrite par Rohila et al (2004) nous aideront à répondre cette question. De façon plus générale, quel est le rôle de AtWhy1 dans les chloroplastes et en quoi affecte-t-il la réponse de défense ? L'utilisation des mutants *atwhy1* caractérisés dans ce mémoire sera sans doute d'une grande utilité pour trouver les pièces manquantes de ce casse-tête.

## 6.0 Références

- Abbink TEM, Peart JR, Mos TNM, Beaulcombe DC, Bol JF, Linthorst HJM.** (2002). Silencing of a gene encoding a protein component of the oxygen-evolving complex of photosystem II enhances virus replication. *Virology*. **295** : 307-319.
- Agrios GN.** (1988). *Plant pathology*. Academic Press inc., San Diego.
- Aoyama T, Chua NH.** (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J*. **11**: 605-612.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Shenn J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*. **415**: 977-983.
- Baeuerle PA, Baltimore D.** (1988). Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell*. **53**: 211-217.
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R.** (2002). Constitutive expression of Ethylene-response-factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J*. **29**: 23-32.
- Bolwell GP.** (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2**: 287-294.
- Bostok RM, Kuc J, Laine RA.** (1981). Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science*. **212**: 67-69.
- Boyle B, Brisson N.** (2001). Repression of the defense gene PR-10a by the single-stranded DNA binding protein SEBF. *Plant Cell*. **13**: 2525-2537.
- Brisson N, Giroux H, Zollinger M, Camirand A, Simard C.** (1989). Maturation and subcellular compartmentation of potato starch phosphorylase. *Plant Cell*. **1**: 559-566.
- Buchanan B, Gruissem W, Jones R.** (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologist, Rockville, Maryland.
- Buttner M, Singh KB.** (1997). *Arabidopsis thaliana* ethylene responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC-box DNA-binding

protein, interacts with an Ocs element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 5961-5966.

**Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong X.** (1994). Characterisation of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell*. **6**: 1583-1592.

**Cao H, Glazebrook J, Clark JD, Volko S, Dong X.** (1997). The *Arabidopsis* *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*. **88**: 57-63.

**Chakravarthy S, Tuori PP, D'Ascenzo MD, Fobert PR, Després C, Martin GB.** (2003). The tomato transcription factor Pti-4 regulates defense-related gene expression via GCC and non-GCC box *cis* elements. *Plant Cell*. **15**: 3033-3050.

**Chang CCC, Bell L, Fryer MJ, Baker NR, Karpinsky S, Mullineux PM.** (2004). Induction of *ASCORBATE PEROXYDASE 2* expression in wounded *Arabidopsis* leaves do not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *Plant J*. **38**: 499-511.

**Chen C, Chen Z.** (2002). Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol*. **129**: 706-716.

**Chen H, Fre S, Slepnev VI, Capua MR, Takei K, Butler MH, DiFiore PP, DeCamilli P.** (1998). Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin mediated endocytosis. *Nature*. **394**:793-797.

**Chen W, Singh KB.** (1999). The auxin, peroxyde and salicylic acid induced expression of the *Arabidopsis* *GST6* promoter is mediated in part by an *ocs* element. *Plant J*. **19**: 667-677.

**Chen Z, Ricigliano JW, Klessig DF.** (1993). Purification and characterization of a soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **90**: 9533-9537.

**Cheng SH, Willmann MR, Chen HC, Sheen J.** (2002) Calcium signalling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependant protein kinase gene family. *Plant Physiol*. **129**: 465-485.

**Cheong YH, Moon BC, Kim JK, Kim CY, Kim MC, Kim IH, Park CY, Kim JC, Park BO, Koo SC, Yoon HW, Chung WS, Lim CO, Lee SY, Cho MJ.** (2003) BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and

mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol.* **132**: 1961-1972.

**Clough SJ, Bent AF.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735-743.

**Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S.** (2001). High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol.* **126**: 480-484.

**Constabel P, Brisson N** (1992). The defense-related *STH-2* gene product of potato shows race-specific accumulation after inoculation with low concentrations of *Phytophthora infestans* zoospores. *Planta.* **188** : 289-295.

**Dangl JL, Jones JDG.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* **411**: 826-833.

**De Camilli P, Chen H, Hyman J, Panepucci E, Bateman A, Brunger AT.** (2002). The ENTH domain. *FEBS Lett.* **513**: 11-18.

**Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotharm M, Cougger C, Somssich IE, Geni S, Marco Y.** (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 2404-2409.

**Deprés C, Subramaniam R, Matton DP, Brisson N.** (1995). The activation of the potato *PR-10a* gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. *Plant Cell.* **7**: 589-598.

**Després C, DeLong C, Glaze S, Liu E, Fobert PR.** (2000). The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell.* **12**: 279-290.

**Després C, Chubak C, Rochon A, Clark R, Bethune T, Desveaux D, Fobert PR.** (2003). The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain / leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell.* **15**: 2181-2191.

**Desveaux D, Després C, Joyeux A, Subramaniam R, Brisson N.** (2000). PBF-2 is a novel single-stranded DNA binding factor implicated in *PR-10a* gene activation in potato. *Plant Cell.* **12**: 1477-1489.

**Desveaux D, Allard J, Brisson N, Sygush J.** (2002). A new family a plant transcription factors displays a novel ssDNA-binding surface. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 512-517.

**Desveaux D, Brisson N.** (2002a). Functional and structural study of the transcription factor PBF-2. Thèse de doctorat, Université de Montréal, Département de biochimie.

**Desveaux D, Subramaniam R, Després C, Mess JN, Lévesque C, Fobert PR, Dangl JL, Brisson N.** (2004). A "Whirly" transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in *Arabidopsis*. *Dev. Cell.* **6** : 229-240.

**Dixon RA.** (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature.* **411**: 843-847.

**Dong J, Chen C, Chen Z.** (2003). Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol. Biol.* **51**: 21-37.

**Durner J, Klessig DF.** (1995). Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2, 6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **92**: 11312-11316.

**Durrant WE, Dong X.** (2004) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 185-209.

**Emanuelson O, Nielsen H, von Heijne G** (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequences. *J. Mol. Biol.* **300** : 1005–1016.

**Euglem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE.** (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5**: 199-206.

**Félix G, Duran JD, Volko S, Boiler T.** (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* **18**: 265-276.

**Ford MGJ, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJK, Evans PR, McMahon HT.** (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature.* **419**: 361-366.

**Geber HP, Seipel K, Georgiev O, Hofferer M, Hug M, Rusconi S, Schaffner W.** (1994). Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science.* **263**: 808-811.

**Genoud T, Buchala AJ, Chua NH, Métraux JP.** (2002). Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* **31**: 87-95.

**Grant M, Mansfield J.** (1999). Early events in host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 312-319.

**Gu YQ, Chao WS, Walling LL.** (1996). Localization and post-translational processing of the wound-induced leucine aminopeptidase proteins of tomato. *J. Biol. Chem.* **271**: 25880-25887.

**Gu YQ, Yang C, Thara VK, Zhou J, Martin GB.** (2000). Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell.* **12**: 71-786.

**Gu YQ, Wildermuth MC, Chakravarthy S, Loh YT, Yang C, He X, Han Y, Martin GB.** (2002). Tomato transcription factors pti4, pti5 and pti6 activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **14**: 817-831.

**Gutterson N, Reuber TL.** (2004). Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 465-471.

**Haldrup A, Lunde C, Scheller HV.** (2003). *Arabidopsis thaliana* plants lacking the PSI-D subunit of photosystem I suffer severe photoinhibition, have unstable photosystem I complexes, and altered redox homeostasis in the chloroplast stroma. *J Biol Chem.* **278** : 33276-33283.

**Hammond-Kosack KE, Jones JDG.** (1996). Resistance gene-dependant defense responses. *Plant Cell.* **8**: 1773-1791.

**Heath MC.** (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 315-319.

**Holub EB, Cooper A.** (2004). Matrix, reinvention in plants: how genetics is unveiling secrets of non-host disease resistance. *Trends Pant Sci.* **9**: 211:214.

**Hyman J, Chen H, Di Fiore PP, De Camilli P, Brunger AT.** (2000). Epsin1 undergoes nucleocytosolic shuttling and its Eps15 interactor NH<sub>2</sub>-terminal homology (ENTH) domain, structurally similar to *Armadillo* and HEAT repeats, interacts with the transcription factor promyelocytic leukemia Zn<sup>2+</sup> finger protein (PLZF). *J. Cell. Biol.* **149** : 537-546.

**Izawa T, Foster R, Chua NH.** (1993). Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J.Mol.Biol.* **230**: 1131-1144.

**Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F.** (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **7** :106-111.



**Jonak C, Ökrész L, Bögre L, Hirt H.** (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinases signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5** : 415-424.

**Jupin I, Chua NH.** (1996). Activation of the CaMV as-1 cis-element by salicylic acid: differential DNA-binding of a factor related to TGA1a. *EMBO J.* **15** : 5679-5689.

**Jurkowski GI, Smith RK Jr, Yu IC, Ham JH, Sharma SB, Klessig DF, Fengler KA, Bent AF.** (2004). Arabidopsis DND2, a second cyclic nucleotide-gated ion channel gene for which mutation causes the "defense, no death" phenotype. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17** : 511-520.

**Katagiri F.** (2004). A global view of defense gene expression regulation – a highly interconnected signaling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 1-6.

**Kjemtrup S, Nimchuk Z, Dangl JL.** (2000). Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 73-78.

**Kliebenstein DJ, Dietrich RA, Martin AC, Last RL, Dangl JL.** (1999). *LSD1* regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**: 1022-1026.

**Kumar D, Klessig DF.** (2003). The high-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **100**: 16101-16106.

**Kunkel BN, Brooks DM.** (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 325-331.

**Kwok EY, Hanson MR.** (2004a). Stromules and the dynamic nature of plastid morphology. *J. Microsc.* **214** : 124-137.

**Kwok EY, Hanson MR.** (2004b). Plastids and stromules interact with the nucleus and cell membrane in vascular plants. *Plant Cell Rep.* **23**: 188-195.

**Lam E, Kato N, Lawton M.** (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature.* **411**: 848-853.

**Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.

**Lagrange T, Hakimi MA, Pontier D, Courtois F, Alcaraz JP, Grunwald D, Lam E, Lerbs-Mache S.** (2003). Transcription factor IIB (TFIIB)-related protein

(pBrp), a plant-specific member of the TFIIB-related protein family. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 3274-3286.

**Lebel E, Heifetz P, Thorne L, Uknes S, Ryals J, Ward E.** (1998). Functional analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* **16**: 223-233.

**Li J, Brader G, Palva ET.** (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell.* **16**: 319-331.

**Mackey D, Holt 3<sup>rd</sup> BF, Wiig A , Dangl JL.** (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell.* **108**: 743-754.

**Maleck K, Levine A, Euglem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA.** (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.* **26**: 403-410.

**Markovic-Housley Z, Degano M, Lamda D, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S, Susani M, Ferreira F, Scheiner F, Breiteneder H.** (2003). Crystal structure of the hypoallergenic isoform of the major birch pollen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J. Mol. Biol.* **325**: 123-133.

**Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G.** (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **54**: 23-61.

**Matton DP, Brisson N.** (1989). Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6** : 325-331.

**Matton DP, Prescott G, Bertrand C, Camirand A, Brisson N.** (1993). Identification of *cis*-acting elements involved in the regulation of the pathogenesis-related gene STH-2 in potato. *Plant Mol. Biol.* **22**: 279-291.

**McDowell JM, Dhandaydham M, Long TA, Aarts MG, Goff S, Holub EB, Dangl JL.** (1998). Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the RPP8 locus of *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **10**: 1861-1874.

**Moisevey GP, Beintma JJ, Fedoreyeva LI, Yakovlev GI.** (1994). High sequence similarity between a ribonuclease from ginseng calluses and fungus-elicited proteins from parsley indicates that intracellular pathogenesis-related proteins are ribonucleases. *Planta.* **193**: 470-472.

**Mortz E, Krogh TN, Vorum H, Gorg A.** (2001). Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics*. **1**: 1359-1363.

**Mou Z, Fan W, Dong X.** (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*. **113**: 935-944.

**Niggeweg R, Thurow C, Kegler C, Gatz C.** (2000). Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of *as-1*-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and auxin-inducible expression of *as-1*-containing target promoters. *J. Biol. Chem.* **26**: 19897-19905.

**Nürnberg T, Scheel D.** (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends in Plant Sci.* **6**: 372-379.

**Peck SC.** (2003). Early phosphorylation events in biotic stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 334-338.

**Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J.** (2000). *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*. **103**: 1111-1120.

**Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Séraphin B.** (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*. **24** : 218-229.

**Robatzek S, Somssich IE.** (2002). Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev.* **16** : 1139-149.

**Robinson SR, Streusand VJ, Chatfield JM, Portis AR.** (1989). Purification of rubisco activase from leaves. *Plant Physiol.* **88** : 1008-1014.

**Rohila JS, Chen M, Cerny R, Fromm ME.** (2004). Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J.* **38** : 172-181.

**Roos W, Evers S, Hieke M, Tschöpe M, Schuman B.** (1999). Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to elicitation of benzophenanthridine alkaloids. *Plant Physiol.* **118** : 349-364.

**Rushton PJ, Somssich IE.** (1998). Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 311-315.

**Salvucci ME, Werneke JM, Ogren WL, Portis AR.** (1987). Purification and species distribution of rubisco activase. *Plant Physiol.* **84** :381-387.

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.

**Schwechheimwe C, Smith C, Bevan MW.** (1998). The activities of acidic and glutamine-rich transcriptional activation domains in plant cells: Design of modular transcription factors for high-level expression. *Plant Mol. Biol.* **36**: 195-204.

**Singh KB, Foley RC, Onate-Sanchez L.** (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 430-436.

**Slaymaker DH, Navarre DA, Clark D, del Pozo O, Martin GB, Klessig DF.** (2002). The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **99**: 11640-11645.

**Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CMJ.** (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell.* **15** : 760-770.

**Stirling PC, Lundin VF, Leroux MR.** (2003). Getting a grip on non-native proteins. *EMBO Rep.* **4**: 565-570.

**Subramaniam R, Després C, Brisson N.** (1997). A functional homolog of mammalian protein kinase C participates in the elicitor-induced defense response in potato. *Plant Cell.* **9**: 653-664.

**Tadege M, Bucher M, Stähli W, Suter M, Dupuis I, Kuhlemeier C.** (1998). Activation of plant defense response and sugar efflux by expression of pyruvate decarboxylase in potato leaves. *Plant J.* **16**: 661-671.

**Taiz L, Zeiger E.** (1998). *Plant Physiology*. Sinauer Associates, inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.

**Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.

**Triezenberg SJ.** (1995). Structure and function of transcriptional activation domain. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**: 190-196.

**Van Loon LC, Van Strien EA.** (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Phys. Mol. Plant. Path.* **55**: 85-97.

**Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J.** (1994) Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell.* **6**: 959-965.

**Wang X.** (2004). Lipid signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 329-336.

**Weigel D, Glazebrook J.** (2002). *Arabidopsis*, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

**Wendehenne D, Durner J, Klessig DF.** (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **7**: 449-455.

**Werneke JM, Chatfield JM, Ogren WL.** (1988). Catalysis of ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase activation by the product of a rubisco activase cDNA clone expressed in *Escherichia coli*. *Plant Physiol.* **87**: 917-920.

**Werneke JM, Chatfield JM, Ogren WL.** (1989). Alternative mRNA splicing generates the two ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase activase polypeptides in spinach and *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **1**: 815-825.

**Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature.* **414** : 562-565.

**Wittstock U, Gershenzon J.** (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 1-8.

**Yu D, Chen C, Chen Z.** (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA-binding protein in the regulation of *NPR1* gene expression. *Plant Cell.* **13**: 1527-1539.

**Zhang N, Portis AR.** (1999). Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **96**: 9438-9443.

**Zhang N, Kallis RP, Ewy RG, Portis AR.** (2002). Light modulation of Rubisco in *Arabidopsis* requires a capacity for redox regulation of the larger Rubisco activase isoform. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **99**: 3330-3334.

**Zhang Y, Tessaro MJ, Lassner M, Li X.** (2003). Knockout analysis of *Arabidopsis* transcription factors *TGA2*, *TGA5* and *TGA6* reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell.* **15**: 2647-2653.

**Zhou JM, Trifia Y, Silva H, Pontier D, Lam E, Shah J, Klessig DF.** (2000). NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 191-202.